

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL - PBGIOEXP  
CENTRO DE ESTUDO EM BIOMOLÉCULAS APLICADAS À SAÚDE – CEBIO  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

**Caracterização de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops bilineata* e  
identificação do gene de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> de classe gama em  
*Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*: um estudo com ênfase no potencial  
biotecnológico**

CARINA GODOY PICELLI

PORTO VELHO - RO

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL - PBGIOEXP  
CENTRO DE ESTUDO EM BIOMOLÉCULAS APLICADAS À SAÚDE – CEBIO  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

**Caracterização de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops bilineata* e  
identificação do gene de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> de classe gama em  
*Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*: um estudo com ênfase no potencial  
biotecnológico**

CARINA GODOY PICELLI

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós Graduação em Biologia  
Experimental da Universidade Federal de  
Rondônia, para obtenção do título em  
Biologia Experimental.

ORIENTADOR: PROF. DR. RODRIGO GUERINO STÁBELI

PORTO VELHO - RO

2013

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Carina Godoy Picelli

**Caracterização de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops bilineata* e identificação do gene de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> de classe gama em *Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*: um estudo com ênfase no potencial biotecnológico**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Rodrigo Guerino Stábili

Aprovado em:

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stábili (Orientador e presidente da banca)

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr<sup>a</sup>. Juliana P. Zuliani

Membro: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Fábio Oliveira

Membro: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Picelli, Carina Godoy.

P591c

Caracterização de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops bilineata* e identificação do gene de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> de classe gama em *Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*: um estudo com ênfase no potencial biotecnológico. / Carina Godoy Picelli. Porto Velho, Rondônia, 2013.

92f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2013.

**Bibliotecária Responsável:** Eliane Gemaque / CRB 11- 549

À MINHA MÃE, *Mirian*.

**DEDICO**

*Ao meu orientador, Rodrigo Guerino Stábeli, que com sua loucura e sabedoria  
me proporcionou descobertas científicas maravilhosas.  
Acima de orientador, um grande amigo.*

*Ao meu Pai, Luiz César Picelli, que à sua maneira me ensinou a ser uma pessoa  
forte.*

*À família Picelli e Godoy, que mesmo distante felicitava cada etapa cumprida  
impulsionando minha vontade de crescer.*

*Ao grande companheiro Onássis Boeri, um amigo valioso de toda a caminhada.*

*Duda e Mel, pelo amor.*

*Muitíssimo obrigada*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao...*

Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz /RO)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Universidade Federal de Rondônia – UNIR

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

*pelo financiamento dos estudos.*

Centro de Pesquisas em Moléculas Aplicadas à Saúde – CEBio

Laboratório de Bioquímica

Phage Display

*por terem me acolhido como aluna.*

Aos Professores *Dr. Andréimar M. Soares* e *Dr. Luís Shozo Ozaki*, que me guiaram com muita sabedoria e paciência durante todo o trabalho.

E às Professoras *Dr<sup>a</sup>. Carla Celedônio* e *Dr<sup>a</sup>. Juliana Zuliani* que contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Ao Professor *Dr. André L. Fuly* e sua equipe,

*pela colaboração nos estudos.*

Aos amigos *Adriana Pontes, Aline Schmitz, Anderson Kayano, Andréa Moura, Cleópatra Caldeira, Ed Teixeira, Elis Paula, Gabriela Luz, George Oliveira, Kayena Zaqueo, Leandro Díhl, Leda Fabiélen, Leticia Helena, Lílian Cantanhede, Marcos Barros, Michele Suelen, Nidiane Reis, Paulo Henrique, Rafaela Diniz, Rodrigo Simões, Rosineide Moto, Soraya Santos e Sulamita Setubal*, por tudo.

Ao *Rafael Bueno*, pelo auxílio, correções e carinho.

*Aos colegas da equipe FIOCRUZ.*



*Janelas do meu quarto,  
Do meu quarto de um dos milhões do mundo que ninguém sabe quem é  
(E se soubessem quem é o que saberiam?)  
Tabacaria, Álvaro de Campos - (15.01.1928)*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Serpente peçonhenta <i>Bothrops bilineata</i>	4
<b>Figura 2.</b> Classificação e mecanismo de ação da superfamília das fosfolipases A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> s)	8
<b>Figura 3.</b> Esquema de trabalho realizado no estudo para caracterização do veneno bruto da <i>Bothrops bilineata</i> .	15
<b>Figura 4.</b> Serpentes amazônicas utilizadas no trabalho de identificação de $\gamma$ PLI	20
<b>Figura 5.</b> Avaliação <i>in vivo</i> do efeito miotóxico do veneno de <i>B. bilineata</i> em camundongos	24
<b>Figura 6.</b> Avaliação por espectrometria da atividade fosfolipásica do veneno sobre substrato cromogênico	27
<b>Figura 7.</b> Análise da atividade hidrolítica do veneno sobre substratos fosfolípidicos fluorescentes	27
<b>Figura 8.</b> Análise da influência do pH sobre a atividade fosfolipásica do veneno	28
<b>Figura 9.</b> Avaliação do efeito de metais divalentes na hidrólise de substrato fosfolipídico	28
<b>Figura 10.</b> Fracionamento de proteínas do veneno da <i>Bothrops bilineata</i>	30
<b>Figura 11.</b> Gel de poliacrilamida das frações BiliTX 1-7	31
<b>Figura 12.</b> Avaliação da atividade fosfolipásica de BiliTX-7	31
<b>Figura 13.</b> Gel bidimensional da fração BiliTX-7 isolada de <i>B. bilineata</i>	32
<b>Figura 14.</b> Gel de agarose do material genético amplificado do tecido hepático das serpentes	33
<b>Figura 15.</b> Gel de agarose dos clones do gene do PLI de <i>M. lemniscatus</i>	33
<b>Figura 16.</b> Gel de agarose dos clones do gene do PLI de <i>B. atrox</i>	34
<b>Figura 17.</b> Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos pelo programa <i>ClustalW</i> .	36
<b>Figura 18.</b> Alinhamento múltiplo para análise das sequências do inibidor de PLA <sub>2</sub> de <i>M. lemniscatus</i> .	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Diversidade de espécies ofídicas do Estado de Rondônia	1
<b>Tabela 2.</b> Inibidores endógenos de fosfolipases A <sub>2</sub> isolados de serpentes	13
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos para amplificação de PLIs de serpentes amazônicas	20
<b>Tabela 4.</b> Quantificação das proteínas do veneno bruto das serpentes utilizadas no estudo	23
<b>Tabela 5.</b> Análise comparativa entre as sequências At.PLI1 e At.PLI2 pelo programa <i>BLASTn</i>	35
<b>Tabela 6.</b> Características bioquímicas do inibidor de fosfolipases A <sub>2</sub> de <i>Bothrops atrox</i> comparada com de outras serpentes	37
<b>Tabela 7.</b> Análise das sequências Mi.PLI1 e 2	37
<b>Tabela 8.</b> Similaridade das sequências utilizadas para análise do inibidor de <i>Micrurus lemniscatus</i>	39
<b>Tabela 9.</b> Características bioquímicas do inibidor de Fosfolipases A <sub>2</sub> de <i>Micrurus lemniscatus</i> comparada com de outras serpentes	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

- At.PLI:** Sequência correspondente ao gene do inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> de *Bothrops atrox*
- Bili-TX:** Fosfolipase A<sub>2</sub> isolada no presente estudo
- BLAST:** Ferramenta de alinhamento local básico (Basic local alignment and search tool).
- BthTX-I:** Fosfolipase A<sub>2</sub> básica, Lys-49 isolada
- CDR:** domínio rico em cisteína
- CE:** concentração eficaz
- CK:** creatina cinase
- cPLA<sub>2</sub>:** fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo citosólicas
- CRD:** domínio de reconhecimento de carboidratos
- CTLD:** Domínio de lectinas tipo C
- DM43:** Inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> isolado de marsupiais
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- EDTA:** ácido etilenodiamino tetra acético
- EPM:** Erro padrão médio
- HPLC:** Cromatografia líquida de alta performance
- ICAM:** moléculas de adesão intracelular
- iPLA<sub>2</sub>:** fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo intracelulares
- IPTG:** Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
- Ly-6:** *Lymphocyte antigen -6*, superfamília de proteína que possui regiões de resíduos de cisteína
- Mi.PLI:** Sequência correspondente ao gene do inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> de *Micrurus lemniscatus*
- NBD-PA:** Fosfolipídio fluorescente, ácido fosfatídico
- NBD-PC:** Fosfolipídio fluorescente, fosfatidilcolina
- ORF:** *open reading frame*
- PAF-AH:** acetilhidrolases de fatores ativadores de plaquetas
- PBS:** Salina tamponada em fosfato
- PCR:** Reação em cadeia da Polimerase
- pI:** ponto isoelétrico
- PLA<sub>2</sub>s:** fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo secretadas
- PLIs:** Inibidor de fosfolipases A<sub>2</sub>
- PrTX-I:** fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno da *Bothrops pirajai*

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**svPLA<sub>2</sub>:** fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos de serpentes (snake venom phospholipases A<sub>2</sub>)

**VB:** Veneno bruto

**X-Gal:** bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

## SUMÁRIO

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>1</b>
1.1 SERPENTES	1
1.1.1 <i>Bothrops bilineata</i>	2
1.2 TOXINAS OFÍDICAS E SEUS INIBIDORES	5
1.2.1 Fosfolipases A <sub>2</sub>	5
1.2.2 Inibidores de fosfolipases A <sub>2</sub>	9
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2.1.1 Veneno da <i>Bothrops bilineata</i>	14
2.1.2 <i>Bothrops atrox</i> e <i>Micrurus lemniscatus</i>	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO VENENO DE <i>Bothrops bilineata</i>	15
3.1.1 Peçonha	15
3.1.2 Camundongos	15
3.1.3 Determinação quantitativa de proteínas	16
3.1.4 Atividade Miotóxica	16
3.1.5 Atividade fosfolipásica	16
3.1.6 Fracionamento do veneno bruto	17
3.1.7 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)	17
3.1.8 Atividade fosfolipásica da fração isolada	18
3.1.9 Eletroforese bidimensional	18
3.1.10 Análise estatística	19
3.2 IDENTIFICAÇÃO DO GENE DE $\gamma$ PLI	19
3.2.1 Tecido hepático das serpentes	19
3.2.2 Extração de RNA total	20
3.2.3 Síntese de cDNA	20
3.2.4 Desenho e síntese dos oligonucleotídeos	20

3.2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
3.2.6 Clonagem dos fragmentos	21
3.2.7 Extração plasmidial	22
3.2.8 Sequenciamento de DNA	22
3.2.9 Análise das sequências	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
4.1 <i>Bothrops bilineata</i>	23
4.2 Identificação e análise dos inibidores de fosfolipases A <sub>2</sub>	32
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>43</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>56</b>

## RESUMO

**PICELLI, C. G. Caracterização de fosfolipases A<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops bilineata* e identificação do gene de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> de classe gama em *Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*: um estudo com ênfase no potencial biotecnológico.** 2013. 92 fls. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental - Universidade Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho, 2013.

A Amazônia representa a maior concentração e diversidade de espécies de serpentes do território brasileiro. No entanto, o conhecimento científico, dos componentes de venenos e secreções da maioria destas espécies ainda é desconhecido. Várias moléculas ativas presentes nos venenos de serpentes são alvos de estudo, inclusive para protótipos de novos fármacos. Entre elas estão as fosfolipases A<sub>2</sub>, uma superfamília de enzimas com atividade na membrana celular e também envolvidas em diversos processos fisiopatológicos no envenenamento. O presente estudo teve como objetivo analisar o potencial biotecnológico relacionado às fosfolipases A<sub>2</sub> de três serpentes endêmicas na região amazônica: *Bothrops bilineata*, *Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus*.

A *Bothrops bilineata* é uma serpente considerada rara, e pouco se conhece cientificamente. Por isso, desperta interesse pela intensa toxicidade que o veneno possui nos casos ofídicos registrados. As alterações miotóxicas ocasionadas por esse veneno foram avaliadas mensurando os níveis séricos de creatina cinase. O veneno da *B. bilineata* ocasionou mionecrose intensa nos camundongos avaliados. Além disso, apresentou elevada atividade fosfolipásica. Desta forma, a peçonha foi fracionada em uma única etapa cromatográfica (C18 25mm X 4,6mm, 5 µm). Foram identificadas sete frações com massa molecular semelhante à fosfolipases A<sub>2</sub> foram obtidas (14 a 18 kDa). A fração BiliTX-7 demonstrou atividade catalítica intensa sobre fosfolipídios (fosfatidilcolina e ácido fosfatídico) e a presença de várias isoformas foram identificadas por eletroforese bidimensional demonstrando possivelmente diferenças de glicosilação.

Estudos de inibição de PLA<sub>2</sub>s e seu contexto fisiopatológico são necessários. Assim, as espécies *B. atrox* e *M. lemniscatus* foram utilizadas para a identificação do gene responsável pela produção de inibidores endógenos de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLIs). O material genético obtido do tecido hepático de cada uma das serpentes foram amplificados, clonados e sequenciado. Os genes de γPLIs foram identificados para as duas espécies (At.PLIγ e MLPLIγ) e alguns parâmetros bioquímicos virtuais foram elucidados. Os dados obtidos servem como base para as proteínas que serão expressas futuramente em sistema de expressão recombinante como forma de continuação do trabalho para aplicação biotecnológica.

**PALAVRAS CHAVE:** Fosfolipases A<sub>2</sub>, *Bothrops bilineata*, *Bothrops atrox*, *Micrurus lemniscatus*, miotoxidade, caracterização bioquímica, inibidores de toxinas, biotecnologia.



## ABSTRACT

**PICELLI, C. G. Characterization of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops bilineata* and gene identification of gamma inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus*: a study with emphasis on biotechnological potential.** In 2013. 92 fls. Dissertation. Graduate Program in Experimental Biology - Federal University of Rondônia, UNITE, Porto Velho, 2013.

The Amazon represents the largest concentration and variety of snake species in the world. However, the scientific knowledge of the snake venoms compounds is very poor. Several active molecules present in snake venoms are targets of study, because of their physiopathologic and for new drugs potential. The Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>) enzyme superfamily, are involved in various pathophysiological processes in the poisoning. Thru, the PLAs have been speculated about its biotechnological potential. The present study aimed to analyze the Phospholipase A<sub>2</sub> activities present in the snake venom of *B. bilineata* and the cloning and sequencing of PLAs natural inhibitor of the *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus*, all of these snakes, endemic in Amazonia forest.

The *Bothrops bilineata* snake shall considered rare and little known scientifically. Thus, this snake possesses large interest in its envenomation comportment. The changes caused by the snake venom myotoxic were evaluated by the measuring of serum creatine kinase levels. The *B. bilineata* venom caused intense myonecrosis in mice. Additionally, showed high phospholipase activity. The *B. bilineata* PLA<sub>2s</sub> was purified by a single chromatographic step (C18 25mm X 4,6mm, 5 µm). Identified seven fractions with molecular mass similar to phospholipase A<sub>2</sub> were obtained (14-18 kDa). The fraction BiliTx-7 showed strong catalytic activity on phospholipids (phosphatidylcholine and phosphatidic acid) and the presence of various isoforms by 2D-electrophoresis which showed possible differences in glycosylation.

Studies of PLA<sub>2</sub> inhibition and its pathophysiologic context are required. Thus, the species *B. atrox* and *M. lemniscatus* were used to identify the gene responsible for production of endogenous inhibitors of phospholipases A<sub>2</sub> (PLIs). The genetic material obtained from hepatic tissue of each of the serpents were amplified, cloned and sequenced. PLIs genes were identified for both species (At.PLIγ and MI.PLIγ) and some biochemical parameters were elucidated. These data are very relevant for proteins production through genetic engineering hall possible way of PLAs inhibition in biotechnological applications.

**KEY-WORDS:** Phospholipases A<sub>2</sub>; *Bothrops bilineata*, *Bothrops atrox*, *Micrurus lemniscatus*; myotoxicity, biochemical chracterization, toxins inhibitors, biotechnology.

# 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 SERPENTES

No mundo são descritas aproximadamente 3.378 espécies de serpentes. Um quinto delas é considerado produtoras de venenos e estão divididas entre quatro famílias: Viperidae, Atractaspididae, Elapidae e Colubridae (UETZ, 2012; BRASIL, 2012).

No Brasil existe cerca de 380 espécies registradas e 55 são consideradas peçonhentas, agrupadas em quatro gêneros das famílias Elapidae (*Micrurus*) e Viperidae (*Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*) (BÉRNILS; COSTA, 2012).

A Amazônia representa o bioma de maior concentração e riqueza de serpentes, um território vasto de estudo ainda a ser explorado. Pois, ainda é relativamente comum nesta região o encontro de novas espécies (VITT, 1987; CALDWELL, 1996; VITT, 1996; VOGT; MOREIRA; DUARTE, 2001; SOUZA, 2002; AZEVEDO-RAMOS; GALATTI, 2002; CALDWELL; LIMA, 2003; AVILA – PIRES; HOOGMOED; VITT, 2007; SBH, 2012).

Campbell e Lamar descreveram em 1989 a ocorrência de sete serpentes da família Viperidae no Estado do Amazonas: *Bothrops bilineata*, *Bothrops taeniata*, *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Crotalus durissus*, *Lachesis muta muta* e *Porthidium hyoprora* (CAMPBELL; LAMAR, 2004). No Estado de Rondônia (Amazônia Sul ocidental), estão descritas 18 espécies peçonhentas, pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae (Tabela 1).

Tabela 1. Diversidade de espécies ofídicas do Estado de Rondônia\*.

Espécie	VIPERIDAE	ELAPIDAE
	<i>Bothrops bilineata bilineata</i>	<i>Micrurus albicinctus</i>
	<i>Bothrops bilineata smargadina</i>	<i>Micrurus hemprichii</i>
	<i>Bothrops taeniata</i>	<b><i>Micrurus lemniscatus</i></b>
	<i>Bothrocophyas hyophora</i>	<i>Micrurus mipartitus</i>
	<i>Bothrocophyas microphthalmus</i>	<i>Micrurus cf. ornatissimus</i>
	<i>Bothropoides mattogrossensis</i>	<i>Micrurus paraensis</i>
	<b><i>Bothrops atrox</i></b>	<i>Micrurus spixii</i>
	<i>Bothrops brazili</i>	<i>Micrurus surinamensis</i>
	<i>Crotalus durissus</i>	<i>Micrurus sp.n.</i>
	<i>Lachesis muta</i>	

\*Atualmente, são descritas espécies de serpentes peçonhentas das famílias Elapidae e Viperidae no Estado de Rondônia (BERNARDE; ALBUQUERQUE; TURCI, 2012). As espécies utilizadas no estudo são destacadas em negrito.

### 1.1.1 *Bothrops bilineata*

A *Bothrops bilineata* (Figura 2), é uma espécie de hábito arbóreo que anteriormente recebia nomenclatura *Bothriopsis bilineata*, ou *Bothrops bilineatus* (WIED, 1825; WÜSTER et al., 2002; CARRASCO et al., 2012). Popularmente é chamada de “jararaca verde” ou “cobra papagaio”(WALDEZ; VOGT, 2009). Duas subespécies dessa serpente foram identificadas: *B. bilineata bilineata* (WIED, 1825) e *Bothrops bilienata smaragdina* (HOGE, 1966). Os exemplares capturados até hoje apresentam cor esverdeada e tamanho relativamente menores quando comparados com outras espécies de *Bothrops* (aproximadamente 120 centímetros quando em fase adulta) (BERNARDE et al., 2011).

A distribuição da *B. bilineata* é conhecida nos países da Amazônia: Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil. No território brasileiro, foram identificados registros da *B. bilineata* em regiões de Mata Atlântica e Estados como Amazonas, Acre e Rondônia que compreendem a floresta amazônica (FEIO; CARAMASCHI, 2002; CAMPBELL; LAMAR, 2004; BERNARDE et al., 2011; FERRÃO; RODRIGUES-FILHO; SILVA, 2012).

A *B. bilineata* apresenta registros cada vez mais raros, não só devido ao seu hábito arborícola que dificultam encontrá-la, mas principalmente a destruição dos seus recursos naturais e de seu habitat (CAMPBELL; LAMAR, 2004; WALDEZ; VOGT, 2009). Frente à ocupação humana nesse vasto bioma, problemas ambientais surgem mediante as atividades antrópicas, tornando a busca do conhecimento dessa biodiversidade de extrema importância, inclusive estudos que possam orientar decisões políticas e sociais para o desenvolvimento sustentável e a conservação (NEPSTAD et al., 2000; MEIRELLES-FILHO, 2004; FEARNside, 2006; TABARELLI; GASCON, 2005).

Um caso raro de envenenamento ofídico ocasionado pela *B. bilineata*, ocorrido em “Mata Grande” no Estado da Bahia, foi relatado por (SOUZA, 2007). Os principais sintomas relatados pelo paciente foram descritos como dor intensa e “edema quente” no local da mordida, que progrediram em algumas horas, e não tiveram boa recuperação com a utilização do antiveneno administrado. A sintomatologia demonstrou ser semelhante aos quadros da reação inflamatória tecidual ocasionada por acidentes botrópicos, no entanto, quanto ao edema, geralmente são descritos “edemas frios” em envenenamentos por *Bothrops*. No gênero *Bothrops* o tamanho do animal é um dos fatores principais para o prognóstico no acidente ofídico, ou seja, quanto maior o animal, uma quantidade maior de veneno é injetada e o dano

tecidual é proporcional a essa quantidade. O relato de caso, no entanto, cita que a toxicidade do veneno da *B. bilineata* é surpreendente quando o tamanho da serpente e a quantidade de veneno injetado são levados em consideração, e que o veneno de serpentes de tamanho semelhante, como a *Bothrops leucurus*, não demonstram tal intensidade toxicológica (RODRIGO; SOUZA, 2007). Outro relato de ofidismo que pode ser comparado aos de *B. bilineata*, foi registrado no Estado do Amazonas, onde a espécie *Bothrops taeniata* foi identificada (TORREZ et al., 2009; CARRASCO et al., 2011). Assim como a *B. bilineata*, essa espécie é considerada rara, possui tamanho e hábitos arbóreos semelhantes, assim como algumas atividades biológicas do veneno que já foram caracterizadas (PORTO et al., 2007). Torrez e colaboradores (2009) referiram que o paciente teve hemorragia mínima no local da mordida, os testes de coagulação apresentaram-se normais confirmando a sintomatologia clínica, e ressaltaram que não houve complicações quanto ao tratamento com o soro antiofídico, demonstrando que é eficaz para o tratamento nesses casos, em contraste aos relatos com *B. bilineata* que reportam “envenenamento local grave” e “sangue incoagulável”, como mencionado por Theakston (RODRIGO; SOUZA, 2007).

Os aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos por *B. bilineata* não são representativos quando comparados a outras espécies de serpentes do mesmo gênero, responsáveis por 72,5% dos ofidismos registrados no país (WALDEZ; VOGT, 2009; BERNARDE; GOMES, 2012; BRASIL, 2013). Porém, as manifestações clínicas dos casos isolados desses acidentes ofídicos, despertam interesse ao potencial fármaco-químico que as substâncias dessas peçonhas apresentam (PORTO et al., 2007; RODRIGUES-SIMIONI et al., 2011; CARREGARI et al., 2013).

As toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam ação proteolítica, edematogênica, hemorrágica, miotóxica, necrosante e coagulante (RIBEIRO; JORGE, 1997; KANG et al., 2011). A proporção dessas toxinas nos venenos geralmente é similar entre as serpentes de uma mesma família, porém cada espécie pode apresentar particularidades na composição do veneno e consequentemente na atividade biológica dessas moléculas (CARREGARI, 2011).

A caracterização do veneno da *B. bilineata* demonstrou que a peçonha desta espécie é capaz de induzir uma resposta inflamatória acentuada caracterizada pelo recrutamento de leucócitos e hemorragia, que se correlaciona com uma alta atividade proteolítica encontrada nesse veneno (PORTO et al., 2007).

Foi demonstrado também que o veneno da *B. bilineata smargadina* provoca bloqueio neuromuscular através de um mecanismo pré-sináptico que envolve as fosfolipases A<sub>2</sub> (RODRIGUES-SIMIONI et al., 2011).

Recentemente uma fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno da *B. bilineata* foi isolada, a Bbil-TX. O estudo realizou análises estruturais e quanto às atividades pró-inflamatórias da molécula, evidenciando uma grande quantidade de resíduos básicos e hidrofóbicos que explicam a interação com fosfolipídios carregados negativamente na membrana celular. Demonstrou também que existe homologia entre os aminoácidos da Bbil-TX e de outras fosfolipases A<sub>2</sub> neurotóxicas e miotóxicas de serpentes dos gêneros *Lachesis* e *Crotalus*. A fosfolipase A<sub>2</sub> básica de *B. bilineata*, Bbil-TX, demonstrou ter atividade miotóxica intensa que foi determinada pela elevação dos níveis séricos de creatina cinase nos camundongos estudados e foram observados também o aumento da permeabilidade vascular e produção de diversos mediadores inflamatórios (CARREGARI et al., 2013).



**Figura 1. Serpente peçonhenta *B. bilineata*.** A fotografia mostra o exemplar da espécie que foi utilizada no estudo. Essa serpente apresenta cor esverdeada com manchas amareladas nas laterais e mede aproximadamente 100 centímetros.

## 1.2 TOXINAS OFÍDICAS E SEUS INIBIDORES

As peçonhas de serpentes são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas e possuem grande variedade de atividades biológicas. As proteínas correspondem cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno (MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000; KANG et al., 2011). Várias moléculas presentes nos venenos foram isoladas e caracterizadas como sendo neurotoxinas, citotoxinas, lectinas, fatores de crescimento, desintegrinas, peptídeos funcionais e enzimas. Dentre estas se encontram fosfodiesterases, fosfomonoesterases, 5'- nucleotidasas, NAD-nucleotidasas, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidasas, inibidores enzimáticos, fosfolipases, proteases (metaloproteases e serinoproteases) e peptídeos biologicamente ativos (DHILON et al., 1987; SEILER et al., 1994; FELICORE et al., 2003; FULY et al., 2004; ZULIANI et al., 2005; FELICORE; OLÓRTEGUI; SANCHEZ, 2005; STÁBELI et al., 2006; SANTOS-FILHO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011; CINTRA et al., 2012; CAMPOS et al., 2012; SOUZA et al., 2012; BORDON et al., 2012; RUEDA et al., 2013; MARCUSSI et al., 2013; MARCON et al., 2013; FOX 2013; COUTINHO-NETO et al., 2013).

As toxinas ofídicas ocasionam perturbação fisiológica em suas presas ou em vítimas de acidentes. Os distúrbios estão relacionados principalmente à ação das moléculas que possuem afinidade a receptores ou canais iônicos e de enzimas com atividade catalítica, que promovem o desvio homeostático do sistema nervoso central e periférico, sistemas cardiovascular, neuromotor e coagulação sanguínea. Devido à alta especificidade de ação em moléculas alvo e variabilidade na composição química do veneno que reflete nas propriedades biológicas e na toxicidade, os componentes ativos das toxinas de serpentes são considerados ferramentas farmacológicas para o desenvolvimento de novas drogas (CALVETE, 2009; CASEWELL; HUTTLEY; WEISTER, 2012). Entre as toxinas estudadas, destacam-se as fosfolipases A<sub>2</sub>, pois alguns venenos, principalmente das serpentes da família Viperidae são fontes ricas dessas proteínas (KOH; KINNI, 2011; VONK et al., 2011).

### 1.2.1 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) são uma superfamília de enzimas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação 2-acil éster de glicerofosfolipídios das membranas celulares, originando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, como o ácido araquidônico. Esses produtos metabólicos atuam principalmente como precursores de mediadores inflamatórios

(eicosanóides) todos importantes em vias intracelulares de sinalização, como transmissão neuronal, mitogênese, contração da musculatura lisa e ativação de plaquetas (LOMONTE; GUTIERREZ, 2011; DENNIS et al., 2011; MURAKAMI et al., 2011a;).

As fosfolipases  $A_2$  são amplamente distribuídas na natureza, porém as mais estudadas são aquelas encontradas em tecidos pancreáticos de mamíferos, tecidos vegetais e nas peçonhas de insetos e répteis. Essas enzimas despertam interesse científico dado ao seu envolvimento em efeitos farmacológicos. A elevação ou diminuição da atividade de fosfolipases  $A_2$  pode implicar em efeitos patológicos, que vem sendo estudados atualmente (SRIBAR; KRIZAJ, 2011; MURAKAMI et al., 2011b).

Os produtos da catálise direta de  $PLA_2$ s, lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres, são importantes segundos mensageiros e mediadores de processos patológicos, como a síndrome aguda coronariana, que é a manifestação clínica da progressão da aterosclerose, uma doença de cronificação rápida neste estágio (KARABINA et al., 2010; ABBATE et al., 2012). Alguns fármacos antiinflamatórios que inibem a ação das  $sPLA_2$  são utilizados em humanos como candidatos potenciais na aterosclerose reduzindo o risco cardiovascular. Ensaios de quantificação demonstram que a permanência de altas concentrações dessas enzimas na circulação sanguínea precedem um transtorno cardiovascular de fase aguda, e que elas permanecem algumas horas após o incidente (ROSENSON; HURT-CAMEJON, 2010).

Recentemente tem-se descrito várias síndromes de significativa importância na saúde pública que relacionam direta ou indiretamente ação de fosfolipases. As  $sPLA_2$ s possivelmente estão envolvidas em processos de metástase de células cancerígenas em casos de adenocarcinoma esofágico humano (SADARIA et al., 2011). Em casos de câncer de próstata as  $sPLA_2$ s são altamente expressas e secretadas (OLEKSOWICZ et al., 2012). Essas enzimas são também encontradas em concentrações elevadas no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (COUTHARD et al., 2011). A atividade das  $sPLA_2$ s têm sido investigada em quadros patológicos de câncer epitelial ovariano (CAI et al., 2012). Em manifestações neuropsiquiátricas, como a doença de Alzheimer, os pacientes parecem ter níveis diminuídos de fosfolipases  $A_2$  circulantes (GENTILE et al., 2012).

As  $PLA$ s podem ser agrupadas em famílias segundo sua atividade catalítica: as lisossomais, acetilhidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), citosólicas ( $cPLA_2$ ), intracelulares ( $iPLA_2$ ) e secretadas ( $sPLA_2$ ). Devido a heterogeneidade destas moléculas, atualmente, são apresentadas em 15 grupos numerados de I a XV e alguns subgrupos, segundo suas respectivas características biológicas, estruturais, origem e

mecanismo catalítico, massa molecular e sequência primária (LOMONTE; GUTIERREZ, 2011; DENNIS, 2011).

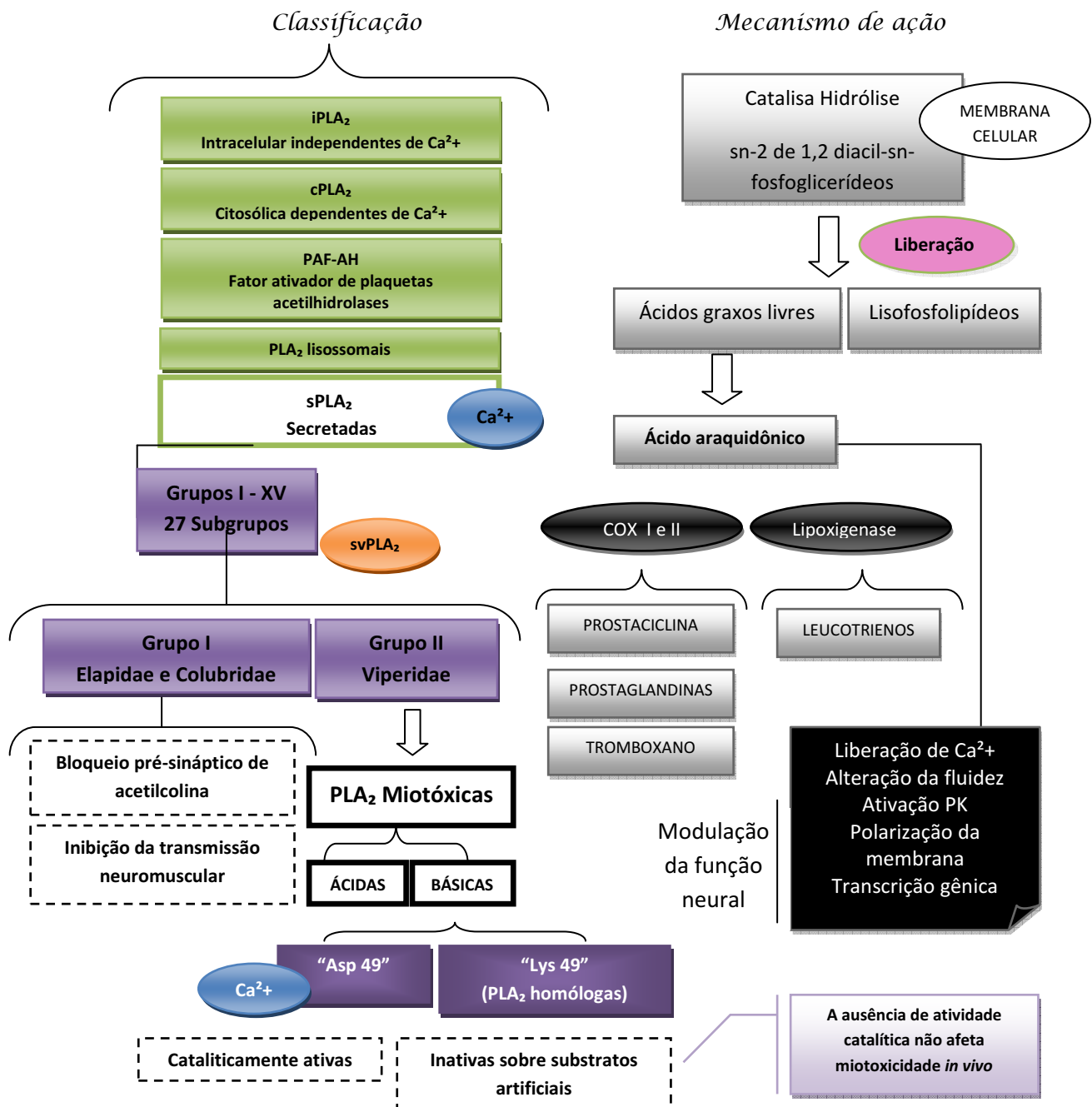
As fosfolipases A<sub>2</sub> secretadas para o meio extracelular apresentam peso molecular entre 14 a 18 kDa, contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. Possuem uma histidina em seu sítio ativo, e requerem a presença do íon Ca<sup>2+</sup> para efetuar a catálise. (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; LAMBEAU; GELB, 2008; DENNIS et al., 2011 SRIBAR; KRIZAJ, 2011 LOMONTE; GUTIERREZ, 2011).

Em venenos de serpentes as svPLA<sub>2</sub>s (*snake venom phospholipases A<sub>2</sub>*) são encontradas em elapídeos e viperídeos, designadas como grupo I e II, respectivamente. O grupo II divide-se em dois subgrupos: (i) PLA<sub>2</sub> Asp 49 que demonstram atividade catalítica moderada, e (ii) PLA<sub>2</sub> símile Lys 49, que apresentam atividade baixa ou nula em substratos artificiais. Ao que parece, essa ausência de atividade enzimática demonstrada *in vitro* não afeta o efeito *in vivo* de toxicidade que as PLA<sub>2</sub>s Lys 49 exercem sobre os músculos (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; SRIBAR; KRIZAJ, 2011).

Na fisiopatologia do envenenamento ofídico, as fosfolipases A<sub>2</sub> são relacionadas à lesão tecidual e mionecrose por um efeito direto de PLA<sub>2</sub>s miotóxicas nas membranas plasmáticas das células musculares. Várias fosfolipases A<sub>2</sub> de serpentes já são bem conhecidas e auxiliam na compreensão de vias metabólicas relacionadas ao envenenamento (SOARES; GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2003; ZULIANI et al., 2005; STÁBELI et al., 2006; SANTOS-FILHO et al., 2008; GASPAR et al., 2011; NUNES et al., 2011; MARCUSSI et al., 2013; SILVEIRA et al., 2013). A Figura 2 ilustra a classificação das fosfolipases A<sub>2</sub> e o mecanismo de ação dessas moléculas.



## FOSFOLIPASES A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s)



**Figura 2. Classificação e mecanismo de ação da superfamília das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s).** As PLA<sub>2</sub>s são classificadas em cinco famílias principais de acordo com o meio onde apresentam atividade, como mostra o lado esquerdo da figura. As sPLA<sub>2</sub> que são secretadas para o meio extracelular são divididas em quinze grupos (I a XV) e subgrupos. Os grupos I e II correspondem às moléculas presentes nos venenos de serpentes. As PLA<sub>2</sub>s do grupo I, característico das famílias de serpentes Colubridae e Elapidae, têm como ação principal o bloqueio pré-sináptico da acetilcolina que ocasiona a inibição da transmissão neuromuscular. As PLA<sub>2</sub>s miotóxicas do grupo II, características da família Viperidae, são subdivididas pelo caráter físico-químico: ácidas e básicas. As ácidas são pouco estudadas até o momento. Por outro lado, sabe-se que as básicas exibem uma característica marcante de presença ou ausência de atividade enzimática quando testadas em substratos *in vitro*. Dessa forma, são nomeadas de Asp 49 e Lys 49 pela posição do aminoácido que determina essa característica catalítica. As PLA<sub>2</sub>s secretadas catalisam a hidrólise de fosfoglicerídeo na membrana da célula que resulta na liberação de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Essas moléculas, como o ácido araquidônico, apresentam atividade celular como a modulação da função neural e podem também ser convertidas em outros mediadores inflamatórios quando catalisados pelas enzimas cicloxigenase (COX I e II) ou lipoxigenase (DENNIS *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub>

As toxinas ofídicas podem ser inibidas por algumas moléculas de diversas naturezas, incluindo agentes químicos, sintéticos, e naturais de origem animal ou vegetal. Por exemplo, heparina de baixo peso molecular, brometo de *p*-bromofenacila, tetraciclina, anticorpos mono/policlonais, flavonoides e alcaloides extraídos de plantas, moléculas provindas de organismos marinhos, inibem as svPLAS2 (SAMY et al., 2012).

Em serpentes também são conhecidas estruturas moleculares com atividade inibitória de toxinas como fosfolipases A<sub>2</sub> e metaloproteinases e estão relacionadas com o mecanismo de prevenção de autoenvenenamento (BIARDI et al., 2011). Além das serpentes, outros animais foram estudados quanto à resistência natural contra peçonhas ofídicas: mamíferos, peixes e alguns invertebrados (MARCUSSE et al., 2007), fungos e bactérias (HAINS et al., 2000).

Um estudo brasileiro de 2012 mostrou a interação e o potencial inibitório da antitoxina denominada DM4, isolada de marsupiais e a principal metaloproteinase hemorrágica isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, jararhagin. Mesmo não se tratando de um inibidor específico para fosfolipase A<sub>2</sub>, o potencial dessas moléculas a serem estudadas é evidente (BRAND et al., 2012). Outro trabalho realizado no país, publicado em 2011 por Santos e colaboradores, demonstrou que o ácido rosmarínico, um componente ativo de extratos vegetais, reduz o bloqueio neuromuscular e os danos teciduais locais causados pela PrTX-I, uma fosfolipase A<sub>2</sub> homóloga isolada do veneno da *Bothrops pirajai* (SANTOS et al., 2011). Princípios ativos extraídos de plantas, que eram usadas no tratamento de acidentes ofídicos são estudadas com a mesma finalidade (SOARES et al., 2005; HAGE-MELIM et al., 2009; SANTOS et al., 2011; SAMY et al., 2012)

Inicialmente com a descoberta dos inibidores naturais de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLIs) no sangue de serpentes, acreditava-se que estes eram produzidos pelo animal somente como forma de proteção contra um possível extravasamento das glândulas veneníferas (OKUMURA et al., 1999; NISHIDA et al., 2010). No entanto, observou-se que algumas serpentes que não eram venenosas também secretavam esses inibidores (SAMY et al., 2012). Posteriormente, propuseram que essas moléculas eram específicas e seletivas para determinados tecidos, onde realizavam ligação de alta especificidade e regulavam a atividade local de PLA<sub>2</sub>s (NOBUHISA et al., 1997; LIZANO et al., 2003; DONNINI et al., 2011). Sabe-se que os PLIs são expressos preferencialmente no fígado (NOBUHISA et al., 1997;

OKUMURA et al., 1999), mas já foram detectados níveis baixos no pulmão, o que reforça a hipótese de influência na regulação da atividade fisiológica local (OKUMURA et al., 2002).

Os PLIs isolados do sangue de serpentes podem apresentar diferenças entre as espécies estudadas (OKUMURA et al., 1999). São glicoproteínas oligoméricas, globulares e ácidas, que apresentam massa molecular de 75 a 180 kDa. O mecanismo de ação dos inibidores com as PLA<sub>2</sub>s secretadas se dá por meio da formação de um complexo solúvel entre eles (LIZANO et al., 2000).

São divididos em três classes, com base nas suas características estruturais e homologia de sequência com outras proteínas, que podem estar presentes em uma única serpente, sendo elas venenosas ou não (DONNINI et al., 2011). Essas classes foram denominadas de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e isoladas em diversas espécies e famílias de serpentes, como mostra a Tabela 3 (LIZANO et al., 2000).

Os  $\alpha$ PLIs apresentam massa molecular de aproximadamente 20 a 25 kDa em três a seis subunidades ligadas não covalentemente, com 147 resíduos de aminoácidos (OKUMURA et al., 2002). Possivelmente existam isoformas dessas proteínas inibidoras assim como nas PLA<sub>2</sub>s, pois existem identificações de substituições de aminoácidos em regiões codificantes (OKUMURA et al., 1999). Têm como característica principal uma estrutura similar ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) das lectinas dependentes de Ca<sup>2+</sup> (CTLCD), presente em várias outras proteínas: apoproteína surfactante pulmonar, proteínas ligantes de manose em mamíferos e o receptor tipo M solúvel (NISHIDA et al., 2010). O mecanismo de ação dos  $\alpha$ PLIs possivelmente está relacionado ao CRD, ligando-se a enzima e inibindo o efeito catalítico das fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonha de serpentes sobre a membrana celular. Acredita-se que os inibidores do tipo  $\alpha$ , sejam específicos para fosfolipases A<sub>2</sub> ácidas do grupo II, mas também são conhecidos alguns capazes de neutralizar os efeitos de miotóxicos de fosfolipases A<sub>2</sub> básicas (LIZANO et al., 1997; 2000).

Os  $\beta$ PLIs são homotrímeros proteicos de 160 kDa, com subunidade de 50kDa (OKUMURA et al., 2002). São estruturas versáteis, capazes de formar um complexo estável com as PLA<sub>2</sub>s, e possuem repetições ricas em leucina, que são domínios presentes em diversas famílias de proteínas capazes de estabelecer interações proteicas. Estes domínios participam ainda do desenvolvimento neuronal, imunidade inata, morfogênese cerebelar, reparo do DNA, adesão celular, transcrição e processamento do RNA e transdução de sinal (LIZANO et al., 2003; OKUMURA et al., 2002; DONNINI et al., 2011). Atualmente, é

descrito que os inibidores do tipo  $\beta$  inibem somente as PLA<sub>2</sub>s básicas do grupo II isoladas de peçonhas de serpentes (OKUMURA et al., 2002; SHIRAI et al., 2009).

Os  $\gamma$ PLIs possuem a maior capacidade de ação inibitória entre os três grupos. Inibem tanto as PLA<sub>2</sub>s ácidas e básicas do grupo II, como as do grupo III em abelhas (OKUMURA et al., 2002). São glicoproteínas ácidas que apresentam peso molecular de 20 a 31 kDa. Foram subclassificadas em dois grupos levando-se em consideração a sequência de aminoácidos, características bioquímicas e o perfil de inibição:  $\gamma$ PLI I e II. O primeiro tem composição heteromérica e duas subunidades (A e B), que apresentam identidade menor que 33% entre si e inibem as PLA<sub>2</sub>s dos grupos I, II e III. O segundo inibe o grupo II preferencialmente e contém uma subunidade apenas. As moléculas  $\gamma$ PLIs possuem dois grupos de repetições intramoleculares com resíduos de cisteína. São estruturalmente similares ao domínio tridactilo encontrados também em receptores CD59, neurotoxinas, receptores de ativador de plasminogênio tipo urocinase (u-PAR) e uma proteína do osso de camundongos que participa de processos de formação e reabsorção de tecidos ósseos (FORTES-DIAS, 2002; FORTES-DIAS et al., 2003; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; MARCUSSI et al., 2007).

A busca moderna de novos fármacos pode se basear no estudo dos compostos por modelagem molecular, síntese química, moléculas de origem vegetal, microbiana e animal. O avanço biotecnológico e da bioinformática ocorrido na última década, possibilita a elucidação dessas estruturas, do mecanismo de ação e análises sobre a origem e evolução dessas moléculas. As toxinas ofídicas apresentam grande potencial terapêutico, porém esses componentes são geralmente inadequados para fármacos e usualmente necessitam de intervenções bioquímicas para que possam ser utilizados. Atualmente alguns trabalhos estão sendo realizados utilizando as informações gênicas contidas na glândula de veneno do animal e a partir da análise transcriptômica é possível o desenvolvimento dessas moléculas por técnicas de expressão gênica com modificações que diminuam suas propriedades tóxicas preservando mesmo assim o potencial biotecnológico (NEIVA, 2009; VALENTE, 2009; LEÃO, 2009; CARDOSO, 2010; ROLDAN; VICENTE, 2012; ZELANI, 2012; REN et al., 2012; PRESKORN; HATT, 2013).

Além dos venenos e de seus componentes isolados, os inibidores endógenos de toxinas ofídicas tem demonstrado que são modelos proteicos com aplicação em problemas biologicamente significantes (DONNINI et al., 2011; KARAKAS; KOENING, 2010). Algumas toxinas, tais como as fosfolipases A<sub>2</sub>, são semelhantes às que participam de processos fisiológicos em humanos, e muitas delas estão envolvidas em processos

patológicos. De forma que as moléculas inibidoras dessas proteínas tornam-se atrativas por terem a capacidade de intervir terapêuticamente nessas patologias (FAURE, 2000; DUNN; BROADY, 2001; FORTES-DIAS, 2002; LIZANO, 2003; MARCUSSI, 2007).

As fosfolipases  $A_2$  são enzimas que estão envolvidas em vários mecanismos patológicos como transtornos vasculares agudos, pancreatite, aterosclerose, doença de Alzheimer, artrite reumatoide, alguns tipos de câncer e também no envenenamento ofídico (PAULA, 2009; KARABINA et al., 2010; ABBATE et al., 2012; ROSENSON; HURT-CAMEJON, 2010; SADARIA et al., 2011; OLEKSOWICZ et al., 2012; COUTHARD et al., 2011; CAI et al., 2012). Sendo assim, é possível prever que os inibidores de fosfolipases  $A_2$  podem ser utilizados como adjuvante da soroterapia de acidentes ofídicos, em terapias ou no diagnóstico de doenças envolvidas com as vias de catálise dessas enzimas (CUNHINGAN et al., 2004; SMART et al., 2004; KOH et al., 2006; COTRIM et al., 2011).

A atribuição de atividade dos inibidores de fosfolipases  $A_2$  se deu pelo isolamento e caracterização bioquímica das moléculas do sangue do animal, mas sabe-se que essa metodologia é ecologicamente inaceitável para aplicações comerciais, mesmo porque as serpentes seriam uma fonte insuficiente desse material. A engenharia genética possibilita a modelagem das estruturas visando diminuir respostas imunogênicas que podem ocorrer na utilização terapêutica desses inibidores (LIZANO et al., 2000; HAINS et al., 2000; HAINS et al., 2001; OKUMURA et al., 2002; LIZANO, 2003; QUIRÓS et al., 2007; CALVETE et al., 2007; SHIMADA et al., 2008).

Nishida e colaboradores (2010) construíram heterotrímeros de inibidores do tipo  $\alpha$  compostos por duas subunidades recombinantes provindas das serpentes *Gloydius brevicaudus* e *Elaphe quadrivirgata*, e demonstraram a importância da interação eletrostática intermolecular na capacidade inibitória que essas proteínas possuem. Ao que parece, a atividade de inibição do trímero é regulada por uma das subunidades que apresenta atividade mais elevada, e não pelo número de subunidades. A combinação dessas estruturas possibilita a construção de moléculas com maior espectro e especificidade de inibição.

Os efeitos citotóxicos e antiproliferativos produzidos por  $\gamma$ PLIs recombinantes provindos da serpente não venenosa *Phyton sebae* foram demonstrados recentemente em células tumorais de camundongos. O inibidor reduziu os tumores em até 60%, a sobrevivência dos animais do ensaio foi prolongada e a atividade demonstrou-se mais intensa nas células tumorais do que nas saudáveis (DONNINI et al., 2011).

**Tabela 2. Inibidores endógenos de fosfolipases A<sub>2</sub> isolados de serpentes\*.**

Classe	Espécie	Família	Inibidor	Mm (kda)	Referência
<b>α</b>	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	Viperidae	GbPLIα	75	Fortes-Dias, 2002
	<i>Bothrops asper</i>		BaMIP	120	Lizano et.al, 1997
	<i>Bothrops moojeni</i>		BmMIP-II	120	Soares et.al, 2003
	<i>Cerrophidion goodmani</i>		CgMIP-II	180	Lizano et.al, 2000
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		PLIα	100	Inoue et.al, 1991
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		PLIα	75	Kogaki et.al, 1989
	<i>Atropoides nummifer</i>		AnMIP	92	Quirós et.al, 2007
	<i>Agkistrodon blomhoffi siniticus</i>		Abs PLIα	100	Ohkura et.al, 1997
	<i>Bothrops jararacussu</i>		αBjussuMIP		Oliveira et.al, 2008
	<i>Protobothrops flavoviridis</i>		PLIα		Shimada et. al, 2008
	<i>Elaphe climacophora</i>	Colubridae	PLIα	51	Shirai et. al, 2009
	<i>Elaphe quadrigata</i>		PLIα-LP		Fortes-Dias, 2002
<b>β</b>	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	Viperidae	PLIβ	160	Fortes-Dias, 2002
	<i>Agkistrodon blomhoffi siniticus</i>		PLIβ		Okumura et. al, 1998
	<i>Elaphe quadrigata</i>	Colubridae	EqPLIb	150	Okumura et.al, 2002
	<i>Elaphe climacophora</i>		PLIb		Shirai et. al, 2009
<b>γ</b>	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	Viperidae	PLI	100	Fortes Dias et. al, 2002
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>		CNF	140	Fortes Dias et. al, 1994
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>		CICS	130	Perales et. al, 1995
	<i>Cerrophidion goodmani</i>		CgMIP-I	110	Lizano et. al, 2000
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>		TftPLIγ		Nobuhisa et.al, 1997
	<i>Agkistrodon blomhoffi siniticus</i>		PLI		Ohkura et. Al, 1997
	<i>Bothrops alternatus</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops erithromelas</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops jararaca</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops jararacussu</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops moojeni</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops neuwiedi</i>		PLIγ		Estevão-Costa et.al, 2008
	<i>Bothrops jararacussu</i>		γBjussuMIP		Oliveira et.al, 2009
	<i>Lachesis muta muta</i>		PLIγ		Fortes Dias et. al, 2003
	<i>Protobothrops flavoviridis</i>		PLIγ		So et.al, 2008
	<i>Protobothrops elegans</i>		PLIγ		Shuhei et. al, 2011
	<i>Naja naja kaouthia</i>	Elapidae	NnkPLIγ	90	Ohkura et.al, 1994
	<i>Notechis ater</i>		NAI	110	Hains et.al, 2000
	<i>Notechis ater serventyi</i>		NAsl		Hains e Broady et.al, 2000
	<i>Notechis scutatus</i>		NSI		Hains et.al, 2001
	<i>Oxyuranus scutellatus</i>		OSI		Hains e Broady et.al, 2000
	<i>Oxyuranus microlepidotus</i>		OMI		Hains e Broady et.al, 2000
	<i>Pseudonaja textilis</i>		PTI		Hains e Broady et.al, 2000
	<i>Elaphe climacophora</i>	Colubridae	PLIγ	130	Shirai et. al, 2009
	<i>Elaphe quadrigata</i>		EqPLIγ		Okumura et.al, 1999
	<i>Laticauda semifasciata</i>	Hidrophidae	LsPLIγ		Ohkura et. al, 1999
	<i>Python reticulatus</i>	Boiidae	PIP		Thwin et.al, 2000

\*Dados obtidos em Fortes – Dias (2002) e dos artigos originais conforme referenciados na tabela.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Analisar o potencial biotecnológico relacionado à interação molecular e mecanismo de ação das fosfolipases A<sub>2</sub> das serpentes endêmicas na região amazônica: *B. bilineata*, *B. atrox* e *M. lemniscatus*.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **2.1.1 Veneno da *B. bilineata***

- ✓ Realizar ensaios de atividade fosfolipásica e miotoxicidade para a caracterização bioquímica e funcional.
- ✓ Purificar e caracterizar fosfolipases A<sub>2</sub> por cromatografia em HPLC, atividade fosfolipásica e eletroforese bidimensional.

#### **2.1.2 *Bothrops atrox* e *Micrurus lemniscatus***

- ✓ Amplificar, clonar e sequenciar o material genético obtido do tecido hepático das serpentes utilizando oligonucleotídeos específicos que codificam o gene dos  $\gamma$ PLI.
- ✓ Verificar a similaridade entre as sequências obtidas e aquelas disponíveis em banco de dados.
- ✓ Identificar domínios conservados para caracterização do tipo de inibidor. Analisar parâmetros bioquímicos da sequência deduzida dos transcritos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DO VENENO DA *Bothrops bilineata*

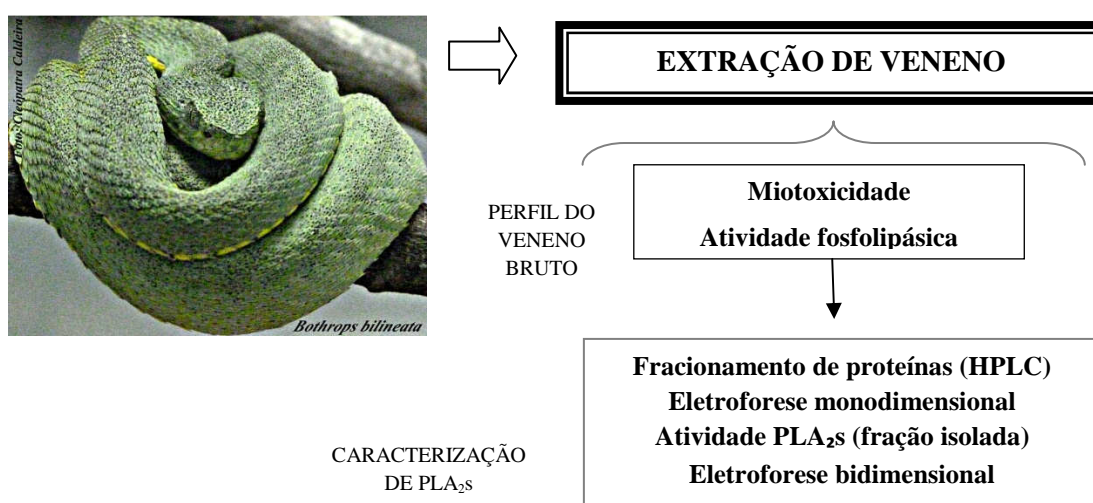
##### 3.1.1 Peçonha

O veneno bruto da serpente *B. bilineata* foi obtido no serpentário do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde – CEBio da Fiocruz - RO, a partir de uma mistura de venenos de vários exemplares adultos. O criatório está certificado pelas seguintes licença: 27131-1 do IBAMA; CGEN – CNPq para acesso das amostras pelo processo nº010627/2011.

Ainda, foram adquiridas do serpentário BioAgents (Batatais-SP) cerca de 4g de peçonha seca das espécies de serpentes: *B. atrox*, *Bothrops brazili*, *Bothrops moojeni*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus terrificus*.

##### 3.1.2 Camundongos

Camundongos da linhagem Swiss, machos (18-20 g), fornecidos pelo Biotério da FIOCRUZ/RO, foram alojados em salas climatizadas e receberam água e ração *ad libitum* até serem utilizados no estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Pesquisa Animal do Instituto de Pesquisa de Patologias Tropicais (IPEPATRO / RO) número de protocolo nº 2012/1, os procedimentos foram realizados de acordo com as especificações contidas no projeto. A metodologia aplicada para atingir os objetivos propostos nesse estudo é demonstrada esquematicamente pela Figura 3.



**Figura 3. Esquema de trabalho realizado no estudo para caracterização do veneno bruto da *B. bilineata*.** A metodologia aplicada no trabalho utilizou os ensaios: atividade miotóxica pela dosagem de CK, atividade fosfolipásica em substratos fosfolipídicos fluorescentes e cromogênicos e cromatografia de fase reversa em coluna C18. O SDS-PAGE, a atividade fosfolipásica e a eletroforese bidimensional foram utilizados para a caracterização de frações isoladas do veneno.



### **3.1.3 Determinação quantitativa de proteínas**

A dosagem de proteínas de todos os venenos e das frações isoladas do veneno de *B. bilineata* foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (1976). A reta padrão foi construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) e analisada através do espectrofotômetro UV/vis em 595 nanômetros.

### **3.1.4 Atividade miotóxica**

A atividade miotóxica foi avaliada de acordo com Stábili e colaboradores (2006) e Souza e colaboradores (2012) mensurando os níveis de creatina cinase no plasma camundongos Swiss após injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio. Foram utilizados 50 µg do veneno bruto da *B. bilineata* diluído em 50 µL de salina tamponada em fosfato (PBS). Foram testados dois grupos de quatro camundongos, um deles era o controle que recebeu injeção contendo somente PBS. Três horas após as injeções, alíquotas do sangue dos camundongos foram coletadas pela veia caudal com heparina e centrifugadas por 20 minutos a 1.530 xg.

A atividade da enzima creatina cinase (CK) foi determinada utilizando 4 µL de plasma dos camundongos incubados com 1,0 mL do tampão reativo do kit CK-NAC cinético (Labtest). As amostras foram incubadas por 3 minutos a 37°C, e lidas em um comprimento de onda de 340 nm em um leitor de microplacas Thermomax (Molecular Devices). A variação da absorbância é diretamente proporcional à atividade enzimática. O resultado foi expresso em unidades por litro (U/L). Uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto.

### **3.1.5 Atividade fosfolipásica**

A atividade enzimática foi avaliada por dois métodos distintos: sobre substratos fluorescentes fosfatidilcolina NBD-(PC) e ácido fosfatídico NBD-(PA), adquiridos da Avanti Polar Lipids Inc., e com o substrato artificial 4N3OBA (Biomol).

Os ensaios utilizando fosfolípidos fluorescentes, foram realizados em colaboração com a equipe do Prof. Dr. André L. Fully da Universidade Federal Fluminense. Os testes de hidrólise de fosfolípidos sintéticos fluorescentes foram realizados em um espectrofluorofotômetro (Shimadzu, RF-5301PC), com comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 e 534 nanômetros, respectivamente. A atividade enzimática de diferentes concentrações do veneno de *B. bilineata* foi monitorada durante 5 minutos, a temperatura

ambiente, após a adição de cada substrato (3,3 mg / mL, concentração final) num meio de reação contendo 50 mM de Tris-HCl, 8 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5.

A influência do pH foi avaliada incubando por 5 minutos o veneno e tampões de pH 3,5 a 11. Em seguida, a atividade enzimática foi iniciada pela adição de NBD-PC. A influência de cátions foi investigada pela substituição do Ca<sup>2+</sup> por outros íons divalentes (Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>) em concentração final de 8mM. Quando indicado, o EDTA (8,3 mM, concentração final), foi adicionado na reação.

A segunda avaliação da atividade fosfolipásica baseou-se no protocolo de Holzer e Mackessy (1996), adaptado para placas de 96 poços. Uma mistura com o 10 µL do veneno bruto da *B. bilineata* tamponado (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> e 100 mM de NaCl, pH 8,0) e 190 µL do substrato artificial 4N3OBA foram incubadas 5 minutos a 37°C e a absorbância foi avaliada em 425 nm no aparelho Espectrofotômetro de Microplacas Eon (Biotek). A atividade enzimática foi calculada pelo aumento da absorbância.

### **3.1.6 Fracionamento do veneno bruto**

O veneno da *B. bilineata* (10 mg) foi ressuspenso em tampão TFA 0,1% (180 µL) e submetidos à cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando a coluna Discovery® C18, 25mm X 4,6mm, 5 µm (Supelco) previamente equilibrada com TFA 0,1% (Solução A). A eluição foi realizada em gradiente linear de 0 a 100% de acetonitrila 99,9% acrescido de TFA 0,1% (Solvente B). As frações foram eluídas a um fluxo constante de 1 mL/minuto. A corrida cromatográfica foi realizada em equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Akta Purifier 10®, Amersham). As eluição das frações foram monitoradas em 215 e 280 nm.

### **3.1.7 Eletroforese monodimensional (SDS-PAGE)**

As amostras foram previamente aquecidas em banho maria a 100° C durante 5 minutos. As condições eletroforéticas como *pH*, força iônica e tampão foram as mesmas definidas por Laemmli (1970). A solução de tampão de corrida para o preenchimento do reservatório da cuba é composta por tris-base a 0,06 mM, glicina a 0,5 mM e SDS a 0,15% (m/v). A corrida eletroforética foi estabelecida em 10 mA, com a potência de 5W durante 1 hora e meia. Foram utilizados o padrão de peso molecular (Sigma) e a BthTX-I (ANDRIÃO-ESCARSO et al. 2000), uma PLA<sub>2</sub> Lys 49 isolada, para avaliação do peso molecular dos

fragmentos obtidos e identificação das PLA<sub>2</sub>s. O gel da separação eletroforética realizada em 15 mA, foi corado com *Comassie blue* ou nitrato de prata.

### **3.1.8 Atividade fosfolipásica de fração isolada**

A atividade fosfolipásica da fração obtida pela cromatografia e analisada em SDS-PAGE monodimensional, foi realizada baseando-se no protocolo de Holzer e Mackessy (1996). Uma mistura entre 10 µL da amostra diluída em água destilada e 190 µL do substrato artificial 4N3OBA (Biomol) foram incubadas 30 minutos a 37°C e a absorbância foi avaliada em 425 nm no aparelho Espectrofotômetro de Microplacas Eon (Biotek). A cinética enzimática foi avaliada pelo aumento da absorbância.

### **3.1.9 Eletroforese bidimensional**

A primeira dimensão foi realizada na fita de 13 cm com valores de *pH* entre 3 a 10 de forma não linear onde os anfólitos estão imobilizados. Após a separação das proteínas de acordo com o ponto isoelétrico (*pI*), a fita foi incubada com agente redutor e iodoacetamida para evita a reoxidação dos grupos tióis. Com isso as proteínas que estão presentes na fita são separadas de acordo com peso molecular no SDS-PAGE.

Após o período de reidratação as fitas foram levadas ao focalizador configurado com as seguintes etapas: (1) 500 V até 500Vh, (2) 1000 V até 800 Vh, (3) 8000 V até 11300 Vh e (4) 8000 V até 3000 Vh. Ao término da focalização as fitas foram equilibradas em duas etapas: 10 mL da solução contendo 6 mM de uréia, 2% (m/v) de SDS, 30% (v/v) de glicerol, 50 mM de tris -HCl a 1,5 mM (*pH*=8,8), 0,002% de azul de bromofenol e 1% (m/v) de DTT para cada fita. Na segunda etapa utilizou-se a mesma solução, porém, o DTT foi substituído por 2,5 % de iodoacetamida. Sendo que cada etapa executada em 15 minutos. A separação das proteínas de acordo com a massa molar foi realizada aplicando-se 25 mA e 100W.

As proteínas presentes nas amostras foram previamente solubilizadas em uma solução detergente (triton X-100 2% (v/v) e SDS 1% (m/v)). O solubilizado foi misturado na razão de 1:1 com tampão de corrida (SDS 4%, azul de bromofenol 0.2%, glicerol 20% e tris 100mM *pH* 6.8). A mistura foi aquecida em banho-maria a 75°C por 15 minutos para serem separadas por SDS-PAGE. Para isso, utilizou-se 20 µL de extrato proteico, em gel descontínuo com dimensões de 10,1 x 7,3 x 1,0 mm.

A separação eletroforética foi realizada a temperatura ambiente e para comparação, a cada corrida eletroforética foram colocados em uma canaleta do gel, 5 µL de marcadores, o padrão de peso molecular da Sigma. Ao término da separação das proteínas, o gel foi lavado com água deionizada durante 5 minutos para a remoção do excesso de SDS.

Em seguida, o mesmo foi corado durante 2 horas, sob leve agitação, usando solução de azul de comassie G-250 a 1% (m/v) preparado com 45% (v/v) de metanol, 45% (v/v) de água deionizada e 10% (v/v) de ácido acético glacial. O gel foi descorado com uma solução, composta por água deionizada, etanol e ácido acético glacial na mesma proporção citada acima. Depois das etapas de coloração e descoloração, as imagens dos géis foram capturadas por meio de *Image Scanner* (Amershan Bioscience).

### 3.1.10 *Análise estatística*

Os resultados que utilizaram análise estatística foram expressos por +/- desvio padrão. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste *t-student*, com valor  $p < 0,05$  considerado como significativo.

## 3.2 IDENTIFICAÇÃO DO GENE DE $\gamma$ PLI

### 3.2.1 *Tecido hepático das serpentes*

O tecido hepático de um espécime adulto de *B. atrox* e uma de *M. lemniscatus* foram coletados imediatamente após a morte do animal por causas naturais (Figura 4). O trabalho teve licença para acesso de amostra de componente do patrimônio genético nº010627/2011 do CNPq e do IBAMA 27131-1. As serpentes foram doadas pela equipe de resgate de fauna da Usina Hidroelétrica de Santo Antônio. O tecido foi armazenado em nitrogênio líquido durante todo o período de estudo, na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ / RO.



**Figura 4.** Serpentes amazônicas utilizadas no trabalho de identificação de  $\gamma$ PLI. Do lado esquerdo observa-se o exemplar da espécie de *M. lemniscatus* e ao lado a de *B. atrox* (Fotografias de Cleópatra Caldeira e Kayena Delaix Zaqueo, 2012).

### 3.2.2 Extração de RNA total

O RNA do tecido hepático das serpentes foi isolado pelo método do “*Trizol Plus RNA Purification Kit*” (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 200 mg do fígado congelado em nitrogênio líquido macerado com adição da solução *RNAlater* (Life Technologies) para preservação do material genético. A amostra eluída foi armazenada em freezer -80°C.

### 3.2.3 Síntese de cDNA

Utilizou-se a metodologia padrão do *Super Script III First-strand Synthesis System for RT-PCR* (Life technologies). Para hibridizar a cauda 3' poly(A) foi utilizado o *primer* Oligo(dT) do kit. O produto foi armazenado em freezer -20°C.

### 3.2.4 Desenho e síntese dos oligonucleotídeos

Para identificação do gene responsável pela expressão de inibidor de fosfolipases A<sub>2</sub> em *B. atrox* e *M. lemniscatus*, foram sintetizados oligonucleotídeos com base nas sequências de nucleotídeos de outros trabalhos realizados anteriormente depositadas no *GenBank*, correspondentes à inibidores do tipo  $\gamma$  (AB462512, AF211168, AF211166, AF211165, AF211163, AJ249829, AB021425, AB559509, EU155177, EU155169 e AB003472). A Tabela 3 mostra as sequências utilizadas e suas identificações.

**Tabela 3. Oligonucleotídeos para amplificação de PLIs de serpentes amazônicas.**

IDENTIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA
PLI (ATG) A - SENSE	5'-ATGAAATCYCTACACACCATCTGCC-3'
PLI (ATG) B - SENSE	5'ATGAAATCYCTACAGATCATCTGTCTTC-3'
PLI (STOP) A - ANTISENSE	5'-ATCAGAGGCTTGCCAATCTGATG-3'
PLI (STOP) B - ANTISENSE	5'-TTATTGTTTTTCAACTTGGATGGC-3'
PLI (STOP) C - ANTISENSE	5'-GGTGACGGAATTATTTCRGAAGGTG-3'

\*As sequências SENSE e ANTISENSE foram identificadas por ATG e STOP como referência à região de ligação no genoma do estudo.

### 3.2.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A segunda fita do cDNA foi sintetizada utilizando 5µL da reação descrita anteriormente combinado com 0,2 µL da enzima *HotMaster™ Taq DNA Polymerase* (5Prime) com o cDNA e um “*pool*” dos oligonucleotídeos na concentração final de 0,2 µM sob as seguintes condições: 95°C por 3 minutos e 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C

por 30 segundos e 70°C por um minuto. O resultado da amplificação do fragmento de DNA obtido foi analisado em gel de agarose a 1% onde as bandas puderam ser visualizadas. Foram utilizados 1 µL de *GelRed*<sup>TM</sup> (Biotium) para identificação através de fluorescência em 5 µL de amostra. Os marcadores utilizados foram *Low Mass DNA Ladder* (Life Technologies) e *100bp DNA ladder* (Biolabs). As amostras positivas na eletroforese foram cortadas do gel de agarose para purificação. O material genético proveniente foi purificado utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O produto foi eluído em água destilada sob centrifugação de 16.000 *xg* por 2 minutos. As amostras foram armazenadas em -20°C.

### 3.2.6 Clonagem dos fragmentos

O produto do PCR foi ligado no vetor de clonagem *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) utilizando as concentrações do protocolo padrão do fabricante. Após o tempo de incubação de 12 h a 4°C. Realizou-se a eletroporação de 1 µL reação de ligação após ter adicionado a mesma em 40 µL da célula *TGI Electrocompetent Cells* (Lucigen), no gelo. O material foi transferido para a cubeta de eletroporação de 0,1cm (*Eletroporation Cuvete*, SIGMA) e levada ao eletroporador. Em seguida, foram adicionados 960 µL de meio de cultura SOC e incubados por 2 horas a 37°C com agitação. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 13.000 *xg*, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em meio de cultura 2xYT (Bacto-tryptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl<sub>5</sub> g pH 7,4, q.s.p 1000 mL de H<sub>2</sub>O). As amostras foram plaqueadas em meio 2xYT ágar dispostos em placas de petri com o antibiótico ampicilina e *X-Gal* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactopyranoside) (Promega), e incubadas em 37°C durante 12 horas.

As colônias que não apresentavam coloração azul foram coletadas aleatoriamente após a incubação e submetidas ao PCR de colônia utilizando 2 µL dos primers T7 e SP6 na concentração de 10 ng/µL (oligonucleotídeos universais que se ligam ao *pGEM®-T Easy Vector Systems* ) e 0,2 µL da enzima *HotMaster<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase*. O ensaio foi realizado sob as seguintes condições: 95°C por 3 minutos e 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e extensão final de 72°C por 4 minutos. A análise de qualidade e quantificação aproximada dos produtos obtidos em todas as etapas foi analisada em gel de agarose 1%, e o produto foi purificado, conforme descrito anteriormente. O produto foi armazenado em 4°C.

### ***3.2.7 Extração plasmidial***

As colônias bacterianas selecionadas, conforme o resultado do PCR de colônia foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura 2xYT, a 37°C por 12 horas. O material foi centrifugado por 5 minutos a 13.000  $\times g$  e o precipitado foi solubilizado pelos tampões do *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen). A extração plasmidial do foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, com modificação na eluição, onde foram utilizados 50  $\mu L$  de água destilada. As amostras foram quantificadas utilizando o aparelho espectrofotômetro da marca NANODROP2000 com OD de 260-280 nm O material foi quantificado e armazenado em - 20°C até ser sequenciado.

### ***3.2.8 Sequenciamento de DNA***

O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático de ABI Prism® 377 (PE Biosynthesis, USA), baseados no protocolo por Sanger e colaboradores (1977). O sequenciamento foi realizado pela empresa *Genomic – Engenharia Molecular* de São Paulo, SP.

### ***3.2.9 Análise das sequências***

A qualidade de cada eletroferograma foi avaliada com a utilização do programa *MEGA5*, e a pesquisa de similaridade com outras sequências correspondentes a inibidores de outras espécies de serpentes utilizou o *BLASTn* de acordo com Altschul (1997) para comparação com banco de dados do *Genbank*. O programa *ORF Finder* foi utilizado para tradução da sequência de nucleotídeos em aminoácidos. O alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas e aminoácidos foram realizados com o programa *Clustal W PBIL*. A busca de similaridade de domínios foi realizada utilizando o programa *BLASTp* utilizando uma sequência de aminoácidos deduzida.

# 1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 1.1 *Bothrops bilineata*

A determinação quantitativa das proteínas do veneno bruto da *B. bilineata* quando comparada com os venenos de *Bothrops atrox*, *Bothrops brazili*, *Bothrops moojeni*, *Lachesis muta* e *Crotalus durissus terrificus*, mostrou uma quantidade maior de proteínas por miligrama de veneno seco conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação das proteínas do veneno bruto das serpentes utilizadas no estudo.

ESPÉCIES DE SERPENTES	PROTEÍNAS DO VENENO (mg/mL)
<i>Bothrops bilineata</i>	0,86
<i>Bothrops atrox</i>	0,56
<i>Bothrops brazili</i>	0,65
<i>Bothrops moojeni</i>	0,72
<i>Lachesis muta</i>	0,67
<i>Crotalus d. terrificus</i>	0,50

\* Os resultados apresentados são representativos sem análises estatísticas por limitação do veneno de *B. bilineata*.

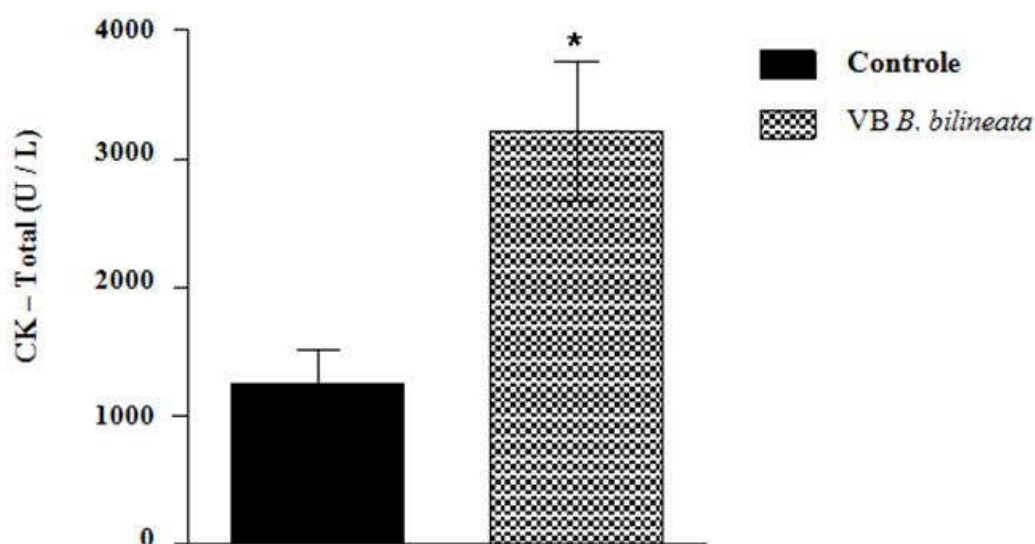
As alterações miotóxicas relacionadas ao veneno da *B. bilineata* foram estudadas pela determinação dos níveis séricos da creatina cinase (CK), uma enzima que é extravasada para a corrente sanguínea quando ocorre lesão muscular. Para avaliar os danos locais causados, uma dose inferior a letal foi utilizada e os níveis enzimáticos foram mensurados após três horas de inoculação baseando-se no trabalho de Souza e colaboradores (2012), que demonstraram a elevação dos níveis dessas enzimas induzidos por *B. atrox* após esse intervalo de tempo. A concentração de creatina cinase foi significativa (3000 U/L) nos camundongos previamente injetados com veneno de *B. bilineata* (Figura 5), mostrando que os dados fisiopatológicos são semelhantes ao apresentado para *B. atrox* (Gutierrez e Ownby, 2003).

As toxinas ofídicas possuem a capacidade de lesar células musculares de uma forma bastante característica, causando mionecrose. A injúria tecidual causada por venenos botrópicos parece relacionar-se a atividade de toxinas como fosfolipases A<sub>2</sub> e metaloproteases que induzem a resposta inflamatória. A catálise dos fosfolipídios da membrana celular pelas fosfolipases A<sub>2</sub> do veneno libera precursores de eicosanoides, que são mediadores e moduladores associados ao controle de muitos processos fisiológicos, principalmente relacionados à inflamação. As metaloproteases, ou hemorraginas destroem células musculares, vasos e tecido conjuntivo ocasionando mionecrose como um efeito secundário relacionado à intensa atividade proteolítica que possuem (para melhor compreensão dos



mecanismos citados neste parágrafo ver FULY et al., 2000; FULY et al., 2003; ZULIANI et al., 2005; STÁBELI et al., 2006; SANTOS-FILHO et al., 2011; NUNES et al., 2011).

O mecanismo pelo qual o veneno da *B. bilineata* ocasionou a miotoxicidade nos camundongos neste estudo não foi bem estabelecido, pois no veneno bruto muitas toxinas atuam em sinergismo (KANG et al., 2011). No entanto, é possível que o efeito observado tenha sido desencadeado por fosfolipases A<sub>2</sub>. Rodrigues-Simioni e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos neurotóxicos e miotóxicos relacionados à atividade fosfolipásica ocasionados pelo veneno da *B. bilineata smargadina*, onde foi demonstrado um aumento significativo dos níveis de creatina cinase em pintainhos após injeções com o veneno, o que corrobora os resultados obtidos nesse estudo.



**Figura 5. Avaliação *in vivo* do efeito miotóxico do veneno de *B. bilineata* em camundongos.** Aumento da creatina cinase (CK) plasmática após injeção de 50µg do VB de *B. bilineata*. Os camundongos previamente injetados com o veneno apresentaram níveis da enzimas em concentração três vezes maior do que os do grupo controle, inoculados com salina tamponada em fosfato (PBS). Os dados são expressos como média ± EPM de experiências individuais (n = 3), segundo método descrito no item 3.1.4 . \* Nível de significância (p <0,05).

A atividade enzimática de fosfolipases A<sub>2</sub> no veneno da *B. bilineata* foi investigada *in vitro* sobre substratos fosfolipídicos cromogênicos e fluorescentes. O veneno foi colocado em contato com um substrato que possui uma estrutura molecular homóloga a um fosfolípido, que ao ser clivado libera um cromóforo, o qual é lido em intervalos sequenciais por espectrofotometria (HOLZER; MACKESSY, 1996). O resultado obtido mostra que as PLA<sub>2s</sub> do veneno estudado possui alta atividade específica que deve ser considerada (Figura 6).

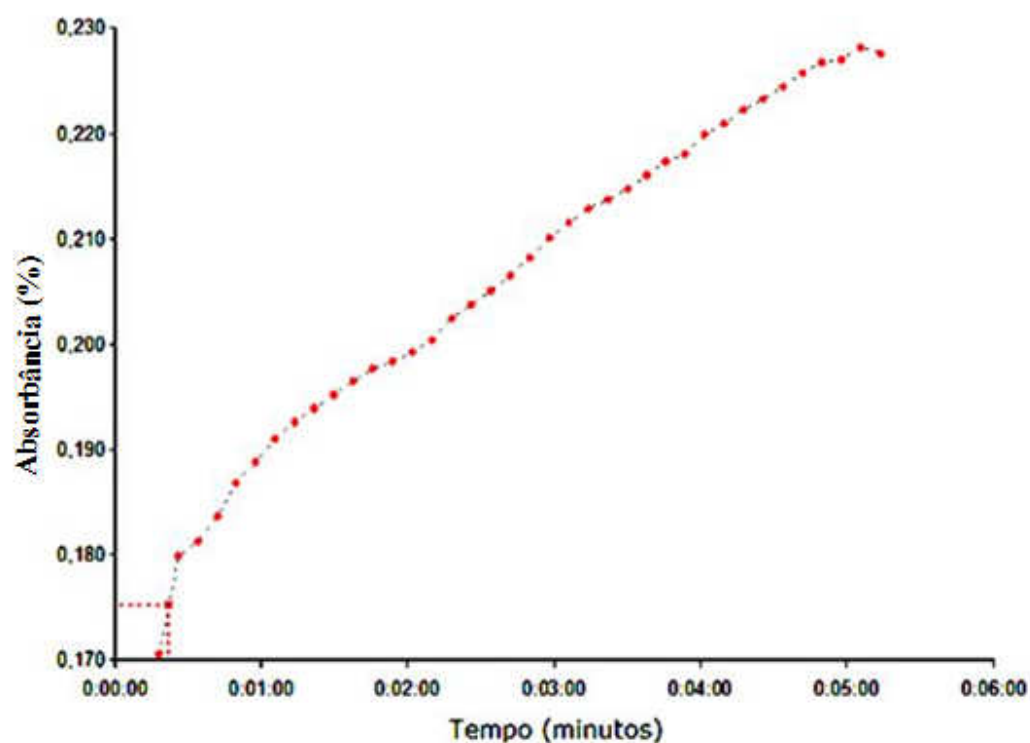
Os fosfolípidos fluorescentes NBD-PC e NBD-PA (fosfatidilcolina e ácido fosfatídico, respectivamente), foram hidrolisados pelo VB de *B. bilineata* de forma concentração-dependente (Figura 7 A e B). A resposta máxima que o veneno foi capaz de produzir foi estimada e a concentração necessária para produzir 50% dessa resposta (concentração eficaz 50%) foi utilizada como parâmetro para os testes seguintes. Os valores eficazes obtidos foram 0,35 µg/mL para fosfatidilcolina e 7,5 µg/mL para ácido fosfatídico. A hidrólise em fosfatidilcolina foi vinte vezes maior do que para o ácido fosfatídico. Como mencionado anteriormente, a *B. bilineata* é uma serpente rara e a quantidade de veneno produzido é pequena, o que limitou uma análise detalhada do mecanismo de ação envolvido, inclusive para outras atividades enzimáticas do veneno (dados não mostrados). Mesmo assim, decidiu-se realizar estratégia de purificação das PLA<sub>2</sub>s deste veneno.

As membranas celulares são formadas principalmente por fosfolipídios, que na maioria das células animais são fosfoglicerídeos. O ácido fosfatídico é o fosfoglicerídeo mais simples e atua como intermediário na síntese de glicerofosfolipídios. Seu grupo fosfato esterificado com a colina, dá origem ao fosfoglicerídeo fosfatidilcolina. Tanto o ácido fosfatídico quanto a fosfatidilcolina podem sofrer ação direta das fosfolipases A<sub>2</sub> liberando o ácido araquidônico (BILLAH *et al.*, 1980). Esses dados sugerem que as fosfolipases A<sub>2</sub> do veneno da *B. bilineata* são capazes de hidrolisar diferentes tipos de fosfolipídios, mas que a fosfatidilcolina é o substrato preferencial assim como nos trabalhos de Rodrigues e colaboradores (2007) e Silveira (2011).

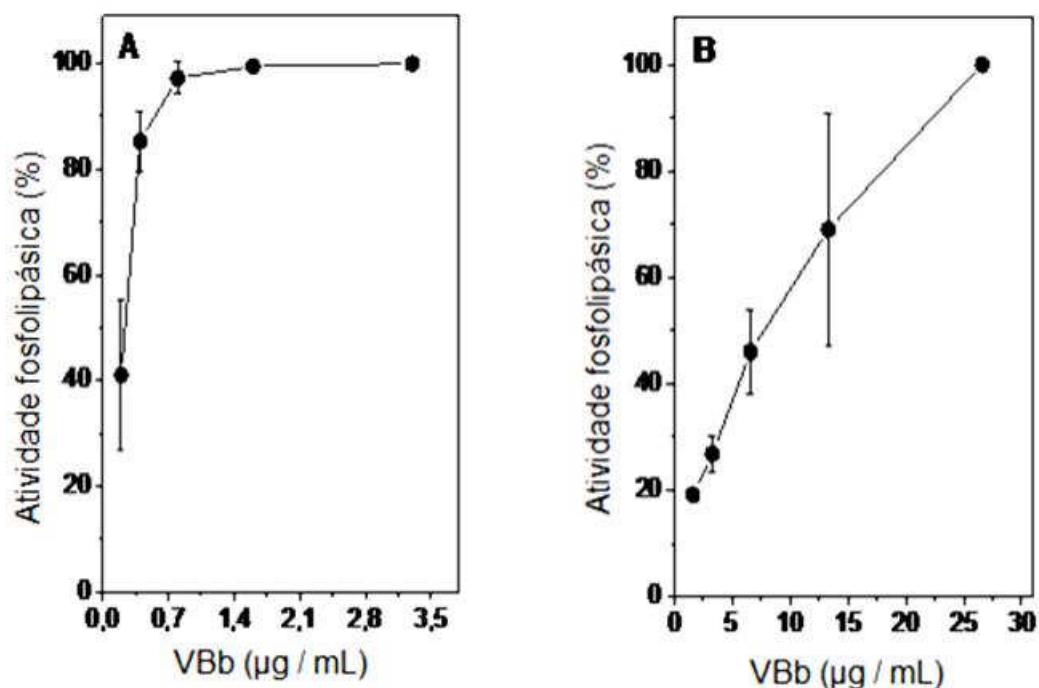
Para a medida de atividade ótima enzimática aparente, o veneno bruto foi incubado em tampões que continham variação de pH de 3,5 a 11. A hidrólise de NBD-PC ou NBD-PA induzida pelo veneno da *B. bilineata* ocorreu no mesmo intervalo de valores de pH: 7,0 a 11. Em ambos os substratos, nos valores de pH 3,5 e 4,5, não foi detectado atividade (Figura 8). Aparentemente as PLA<sub>2</sub>s do veneno de *B. bilineata* possuem um pH ótimo, na faixa entre 7,0 a 11. Possivelmente, com a diminuição do pH da solução, foram fornecidos prótons que ocuparam os sítios catalíticos importantes para o funcionamento proteico, inibindo o seu funcionamento.

A hidrólise do NBD-PC pelo veneno *B. bilineata* ocorreu apenas na presença do íon bivalente Ca<sup>2+</sup>. Não foi observado hidrólise na presença de outros metais bivalentes Ba<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup>. Curiosamente, quando o Ca<sup>2+</sup> foi misturado na reação em conjunto com os outros metais, não houve hidrólise do NBD-PC pelo veneno da *B. bilineata* (Figura 9), assim como em Santos-Filho e colaboradores (2008). Assim, de alguma forma os outros

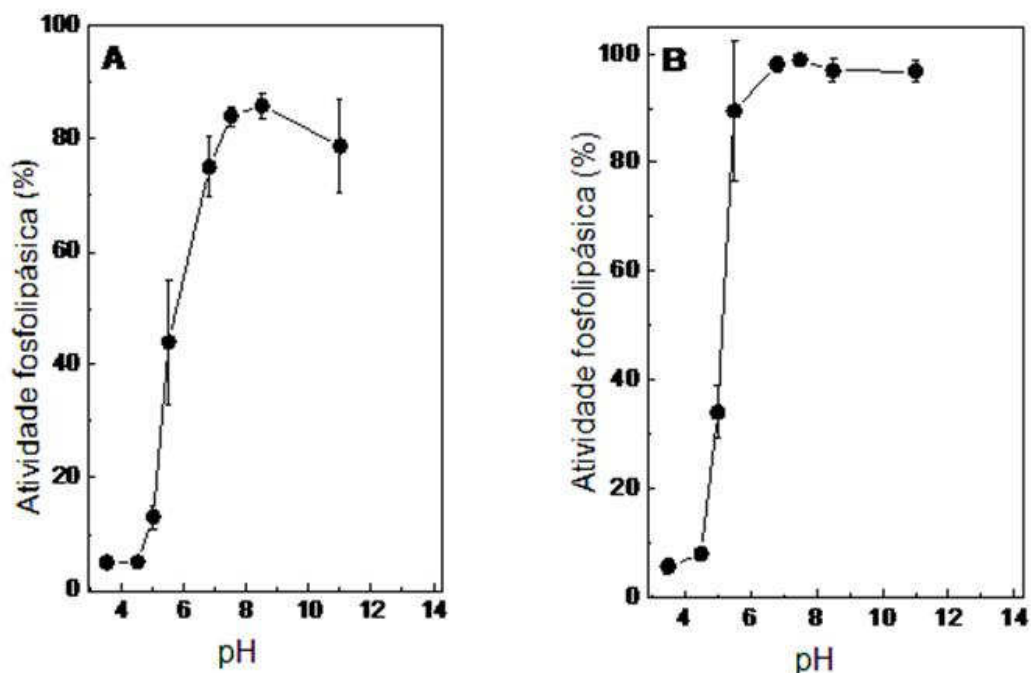
metais inibiram a hidrólise de NBD-PC pelo veneno da *B. bilineata*. Mesmo que o  $\text{Ca}^{2+}$  não seja o íon de maior afinidade para o sítio catalítico, este é o que mostrou melhor atividade enzimática, sugerindo que o mecanismo de ação desta enzima seja semelhante aos clássicos já mostrados na literatura para o estudo de  $\text{PLA}_{2\text{s}}$  de veneno ofídico. Está bem esclarecido que as fosfolipases  $\text{A}_2$  Asp 49 demonstram atividade catalítica elevada ao contrário das fosfolipases  $\text{A}_2$  que possuem uma lisina na mesma posição (Lys 49). Essa alteração estrutural dificulta a ligação do cálcio que é um co-fator essencial para a estabilização da molécula durante a catálise e ocasiona a inatividade enzimática (LOMONTE; GUTIERREZ, 2011; DENNIS, 2011). Como visto, o cálcio é o principal cofator das enzimas cataliticamente ativas do veneno da *B. bilineata*. No entanto a ausência de atividade catalítica pode ocorrer não só em função da estrutura da molécula, mas também pela presença de outros fatores no meio, entre eles os íons metálicos com maior afinidade pelo sítio catalítico.



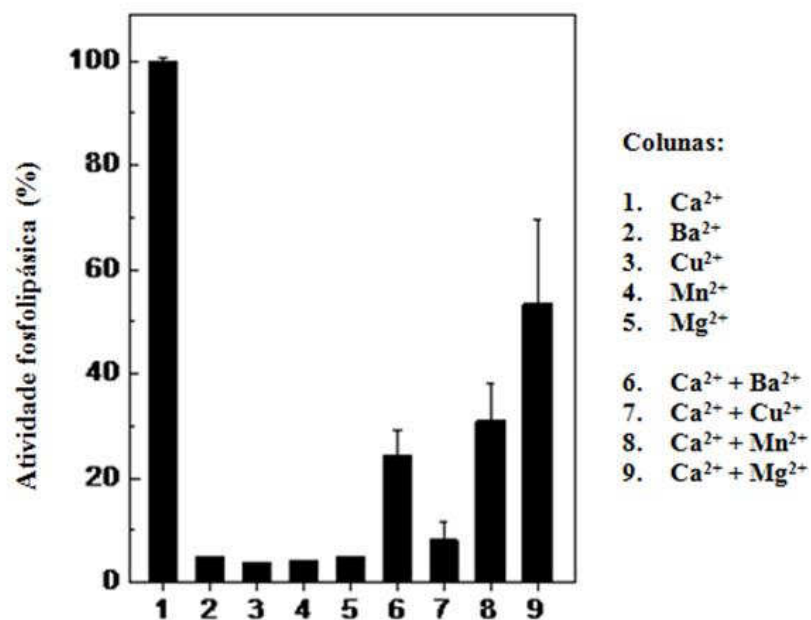
**Figura 6. Atividade fosfolipásica do veneno sobre substrato cromogênico.** Foram submetidos 20  $\mu\text{g}$  de veneno bruto e a atividade foi expressa por gráfico. A atividade de fosfolipases sobre o substrato libera cromóforos que são lidos sequencialmente em comprimento de onda de 425 nm (eixo y) durante 5 minutos (eixo x), formando a linha do gráfico (pontos em vermelho).



**Figura 7. Atividade hidrolítica do veneno sobre substratos fosfolípidicos fluorescentes.** Hidrólise de NBD-PC (Figura A) ou NBD-PA (Figura B) por VB de *B. bilineata* (0,6-27  $\mu\text{g/mL}$ ). Cem por cento da atividade foi conseguida depois de 250 segundos de reação à temperatura ambiente. O eixo x mostra as concentrações de veneno utilizadas na reação e o eixo y o percentual de atividade enzimática observada por leituras espectrofotométricas. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  EPM de duas experiências individuais ( $n = 2$ ).



**Figura 8. Análise da influência do pH sobre a atividade fosfolipásica do veneno.** O veneno (1,6 µg/mL) foi incubado com tampões de diferentes valores de pH (3,5, 4,5, 5,0, 5,5, 6,8, 7,5, 8,5 e 11), durante 5 minutos à temperatura ambiente, e então a reação foi iniciada pela adição de NBD -PC (Figura A) ou NBD-PA (Figura B). Obteve-se 100% de atividade, após 50 segundos de reação. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  EPM de duas experiências individuais (n = 2).



**Figure 9. Avaliação do efeito de metais divalentes na hidrólise de substrato fosfolipídico.** A hidrólise do NBD-PC pelo veneno da *B. bilineata* (1.6 µg/mL) na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (coluna 1),  $\text{Ba}^{2+}$  (coluna 2),  $\text{Cu}^{2+}$  (coluna 3),  $\text{Mn}^{2+}$  (coluna 4) ou  $\text{Mg}^{2+}$  (coluna 5). O  $\text{Ca}^{2+}$  foi misturado com  $\text{Ba}^{2+}$  (coluna 6),  $\text{Cu}^{2+}$  (coluna 7),  $\text{Mn}^{2+}$  (coluna 8),  $\text{Mg}^{2+}$  (coluna 9) e a hidrólise do NBP-PC foi monitorada, como descrito na metodologia. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  EPM de duas experiências individuais (n = 2).

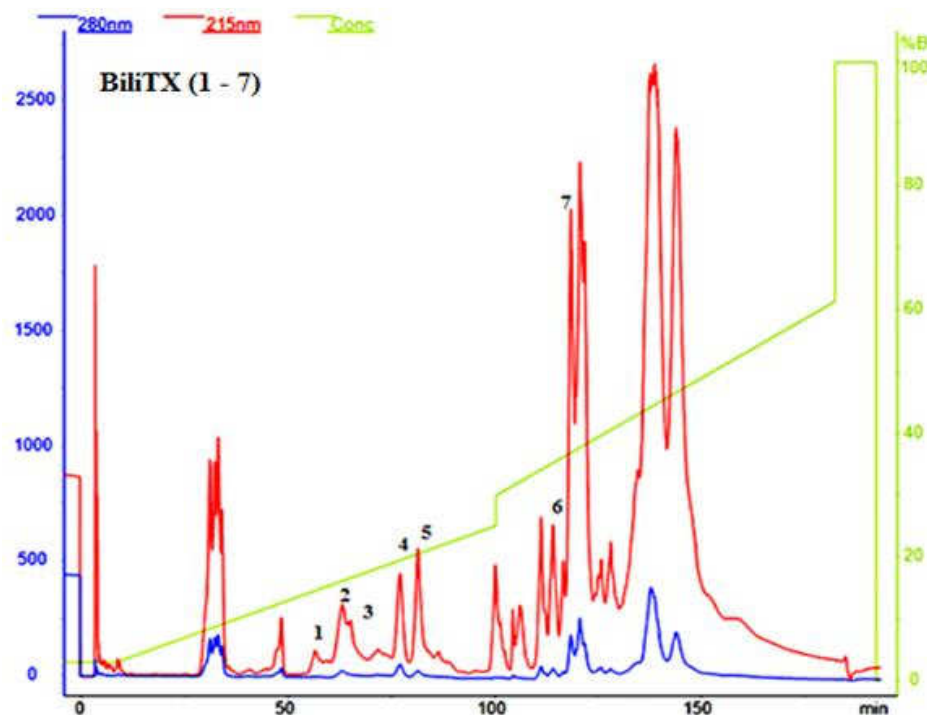
Após os dados obtidos e, para uma melhor caracterização enzimática para a busca de possíveis inibidores naturais como proposto neste trabalho, optou-se pelo fracionamento seguido para a purificação de PLA<sub>2</sub>s desse veneno. Assim, a peçonha foi fracionada utilizando uma única etapa cromatográfica de fase-reversa em coluna C18 (Figura 10). Foram obtidas como resultado 28 frações que foram analisadas em SDS-PAGE para visualização de bandas correspondentes às proteínas do veneno de *B. bilineata* e compatíveis com as fosfolipases A<sub>2</sub> (Figura 10). No gel foram visualizadas sete bandas com pesos moleculares de aproximadamente 17kDa, nomeadas BiliTX 1-7 (Figura 11). A massa molecular observada em BiliTX 1-7 são correspondentes com o das fosfolipases A<sub>2</sub> Bbil-TX de *B. bilineata*, BmooTX-I e BmooPLA<sub>2</sub> isoladas do veneno *B. moojeni*, Bl-PLA<sub>2</sub> de *B. leucurus* e também à BthTX-1 purificada previamente do veneno de *B. jararacussu* por Andrião-Escarso e colaboradores (2000) que foi incluída nesse estudo para comparação do peso molecular (SANTOS FILHO et al., 2008; NUNES et al., 2011; SILVEIRA et al., 2013)

Na cromatografia de fase-reversa a proteína se liga a uma molécula hidrofóbica na fase estacionária, e é separada dos demais componentes com base em sua hidrofobicidade. Usualmente a purificação de fosfolipases A<sub>2</sub> em venenos de serpentes se dá pela combinação de métodos cromatográficos tais como: gel de filtração, RP-HPLC, troca-iônica, exclusão molecular, interação hidrofóbica e a utilização de colunas contendo ligantes específicos (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2007; COSTA et al., 2008; SANTOS-FILHO, 2008; CARREGARI et al., 2013). Para o fracionamento do veneno da *B. bilineata* no presente estudo, optou-se pela realização de uma etapa única de purificação, em função da pequena quantidade de veneno que havia disponível e pela raridade do material, uma vez que os mecanismos de purificação de PLA<sub>2</sub>s são consagrados na literatura.

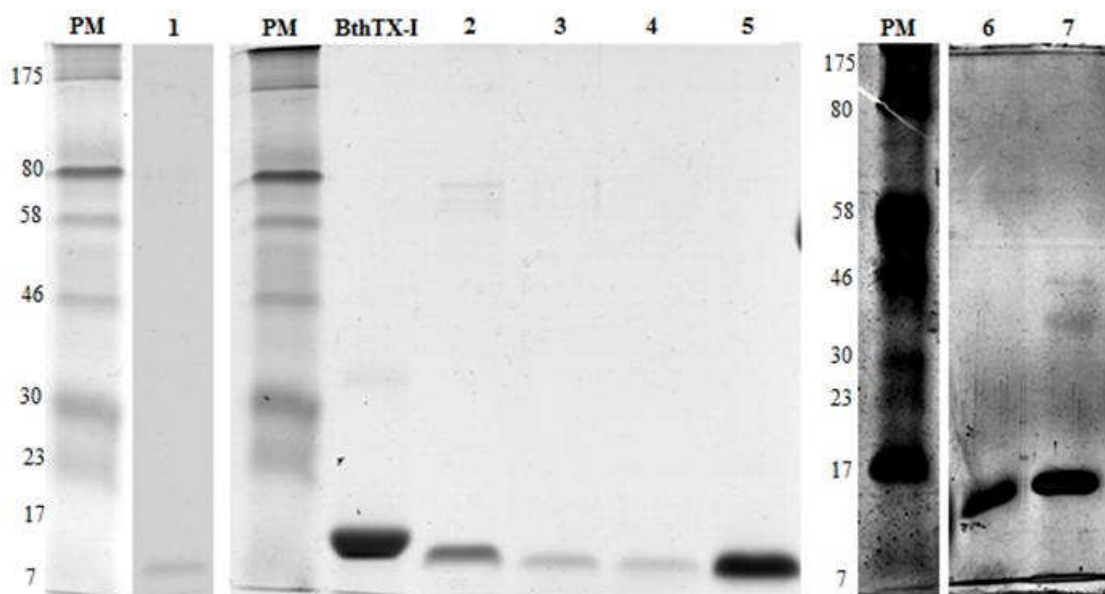
A BiliTX -7 foi selecionada para ensaios de atividade catalítica sobre o substrato cromogênico 4N3NOBA. As proteínas da amostra foram quantificadas em 0,721 mg/mL e a intensa atividade fosfolipásica foi demonstrada durante 30 minutos utilizando 35 µg/mL de BiliTX -7 (Figura 12). O estudo publicado por Carregari e colaboradores (2013) demonstrou que a fosfolipase A<sub>2</sub> básica BBil-TX, isolada do veneno de uma *B. bilineata* da Argentina, apresenta atividade fosfolipásica mais elevada em relação a outros venenos. Esse estudo também mostra dados sobre estabilidade da BBil-TX quanto ao pH (7 a 8,5) e a indução de miotoxicidade local que reforçam os resultados obtidos com o veneno neste estudo.

A pureza da BiliTX-7 foi testada por eletroforese bidimensional. Ao contrário do gel monodimensional, nesse ensaio várias bandas foram identificadas. Todas as bandas

apresentaram massa molecular de aproximadamente 17 kDa, e pontos isoelétricos distintos, indicando a presença de diferentes isoformas de fosfolipases A<sub>2</sub> em BiliTX – 7 (Figura 13), que possivelmente dever ser ocasionada por diferenças de N-glicosilação. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida é uma técnica eficiente de separação simultânea de proteínas, por meio de dois processos consecutivos baseados em propriedades diferentes das proteínas. Na primeira fase, a focalização isoelétrica, as proteínas são separadas no gel formando um gradiente de pH, onde migram até possuírem equilíbrio de suas cargas elétricas. Na segunda fase, essas proteínas são submetidas a uma nova eletroforese, onde são separadas pelo sua massa molecular (SLAIS et al., 2013; QUIAO et al., 2013). É bem conhecido pela literatura que as fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos de serpentes possuem inúmeras isoformas, muitas delas foram bem pouco estudadas até o momento. A presença de várias bandas no gel confirma a diversidade dessas toxinas, tal como é descrito em Lomonte e Gutierrez (2011), Murakami e colaboradores (2011a), Sribar e Krizaj (2011) e Dennis (2011). O estudo prevê a realização de outros ensaios para a separação das isoformas em BiliTX-7 e caracterização bioquímica, funcional e estrutural daquelas que não foram testadas (BiliTX 1- 6). O processo de purificação pode ser considerado efetivo para esta classe de proteínas. Desta forma, as enzimas purificadas foram estocadas para estudos posteriores de inibição por inibidores de PLA<sub>2s</sub> (PLIs) de classe  $\gamma$  das serpentes *B. atrox* e *Micrurus lemniscatus* (dados a seguir).

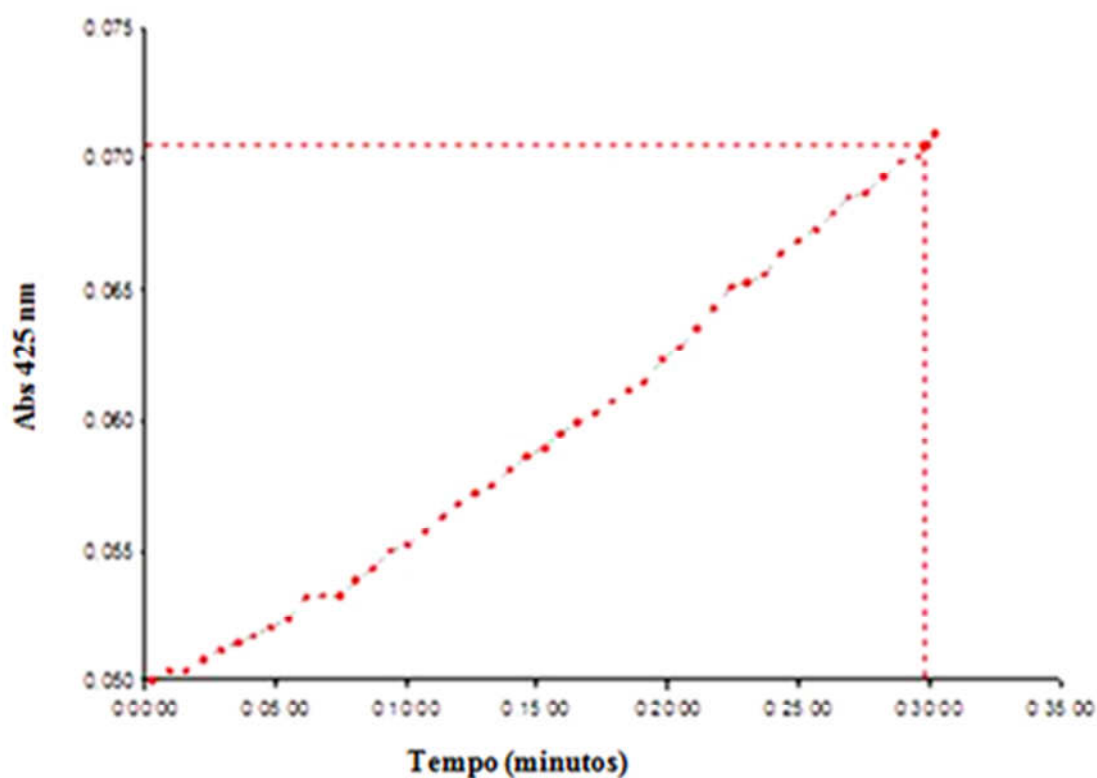


**Figura 10. Cromatografia de fase-reversa do veneno da *B. bilineata*.** Os picos mostrados em azul são as frações proteicas lidas em absorvância de 280nm e em vermelho 215nm. A linha verde demonstra os níveis dos tampões A e B utilizados. A corrida teve duração de 200 minutos. São numeradas as frações correspondentes a BiliTX 1- 7, conforme os picos na cromatografia.

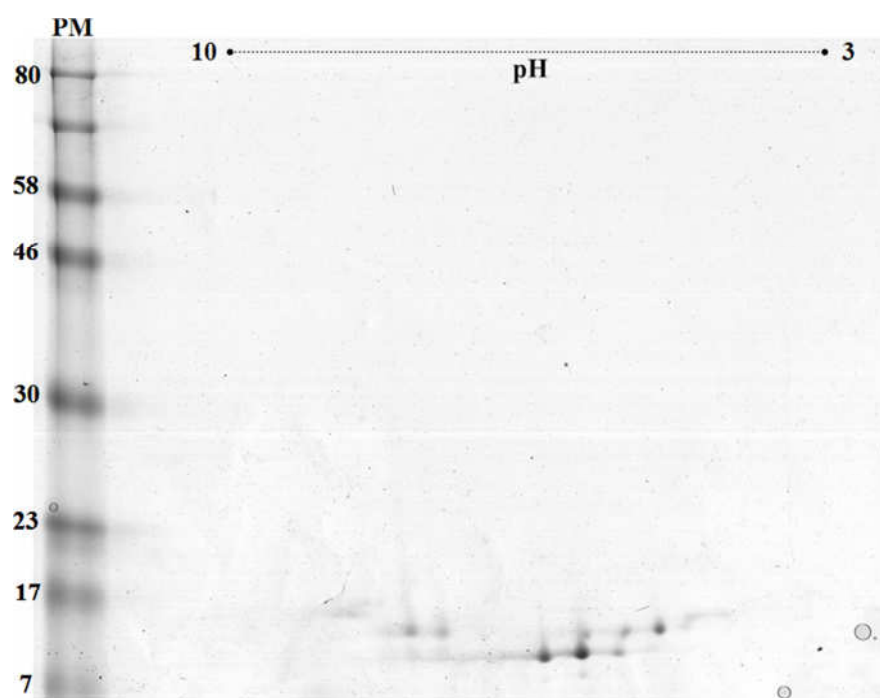


**Figura 11. Eletroforese monodimensional das frações BiliTX 1-7.** Todos os picos obtidos no fracionamento foram submetidos ao SDS-PAGE e 7 alíquotas apresentaram peso molecular de aproximadamente 17 kDa, característicos de enzimas fosfolipases A<sub>2</sub>. Do lado esquerdo, até a amostra 5, corresponde ao gel corado com *Comassie blue*. As frações 6 e 7 foram coradas por nitrato de prata. O peso molecular é identificado por PM na figura. A fosfolipase A<sub>2</sub> BthTX-I foi incluída no gel para comparação com as amostras, como indicado acima.





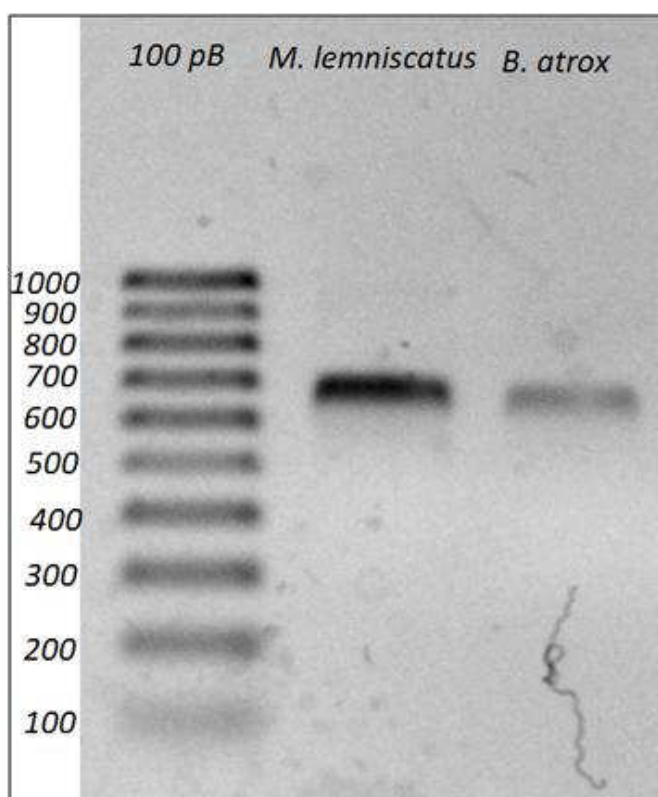
**Figura 12. Atividade fosfolipásica de BiliTX-7.** Durante os 30 minutos de leitura a atividade enzimática foi avaliada utilizando uma concentração de 35 µg/mL da amostra sobre o substrato. O resultado da atividade fosfolipásica foi expresso em gráfico, onde os eixos x e y respectivamente representam o tempo da cinética e a intensidade da absorvância produzida pela degradação enzimática do substrato.



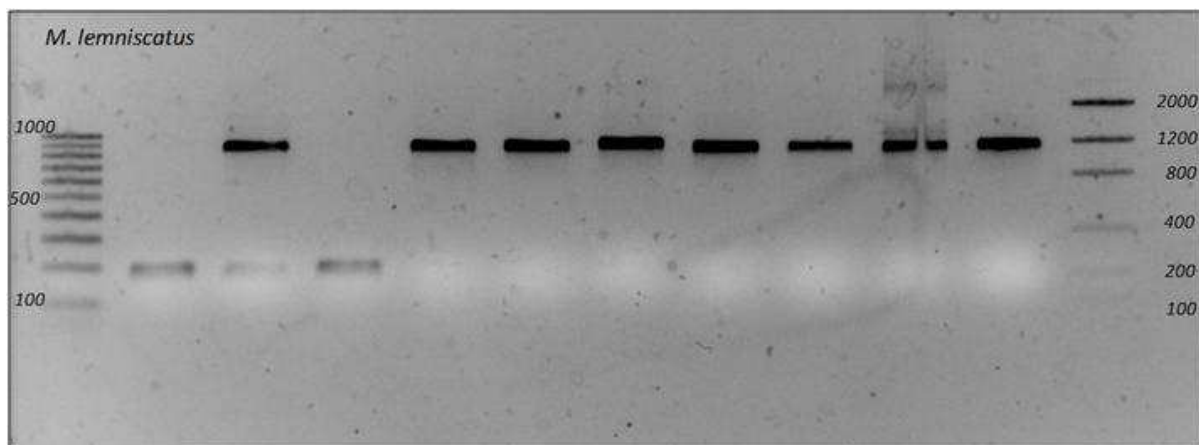
**Figura 13. Eletroforese bidimensional da fração BiliTX-7 isolada de *B. bilineata*.** Na parte de cima é identificada a escala de pH de 3 a 10, como na fita utilizada para o ensaio. Do lado esquerdo são descritos os pesos moleculares conforme o marcador. A fração BiliTX-7 apresentou várias bandas com pesos moleculares próximos a 17 kDa. Os valores de pI foram distintos, indicando a existência de isoformas da fosfolipase A<sub>2</sub> na amostra.

#### 4.2 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS INIBIDORES DE FOSFOLIPASES A<sub>2</sub>

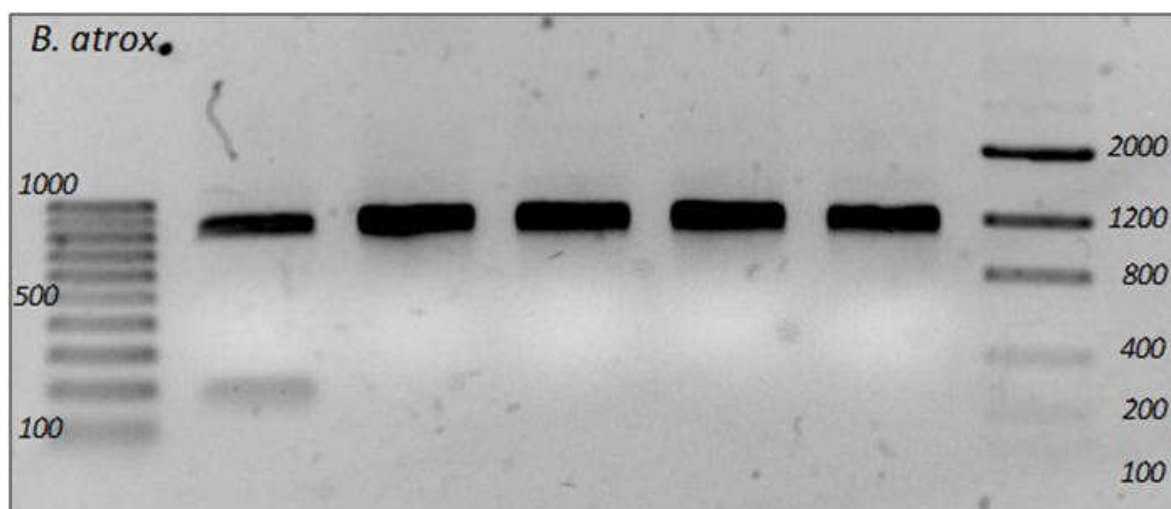
O material genético extraído do tecido hepático da *B. atrox* e *M. lemniscatus* resultou em fragmentos de aproximadamente 600 pares de base (Figura 14). Anteriormente, sequências de nucleotídeos publicadas no trabalho de Fortes-Dias e colaboradores (2003), foram utilizadas como molde para a amplificação do material, porém não se obteve sucesso. As duas serpentes nunca haviam sido estudadas nesse aspecto, subentendendo que havia características genéticas particulares na região de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados anteriormente, ponto inédito levantado no presente estudo. Assim, optou-se pelo desenho e síntese de oligonucleotídeos com base em sequências de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> do tipo  $\gamma$  de diversas famílias de serpentes depositadas no *Genbank*. Na reação de PCR, utilizou-se um *pool* dessas sequências para obtenção do resultado. Em seguida, as amostras foram purificadas e a clonagem no vetor *pGEM®-T Easy*, resultou em 5 clones para *B. atrox* e 8 clones para *M. lemniscatus* (Figuras 15 e 16). As colônias positivas foram cultivadas e o DNA plasmidial foi extraído, quantificado e selecionado para o sequenciamento como referido na metodologia. As concentrações obtidas na quantificação foram de 74  $\mu\text{g/mL}$  a 218  $\mu\text{g/mL}$  para *B. atrox* e 58  $\mu\text{g/mL}$  a 300  $\mu\text{g/mL}$  para *M. lemniscatus*.



**Figura 14. Gel de agarose do material genético amplificado do tecido hepático das serpentes.** O gel de agarose a 1% do purificado foi corado com *Gel Red* e o marcador de 100 pB foi utilizado para mensurar o tamanho do fragmento. Os fragmentos de aproximadamente 600 pB correspondem às serpentes *M. lemniscatus* e *B. atrox*, respectivamente.



**Figura 15. Gel de agarose dos clones do gene do PLI de *M. lemniscatus*.** As oito bandas que podem ser visualizadas correspondem ao inserto e a região do vetor de clonagem, selecionados pelos primers universais T7 e SP6. O gel de agarose a 1% foi corado com *Gel Red* e o marcador de 100 pB foi utilizado para mensurar o tamanho do fragmento.



**Figura 16. Gel de agarose dos clones do gene do PLI de *B. atrox*.** As cinco bandas que podem ser visualizadas correspondem ao inserto e a região do vetor de clonagem, selecionados pelos primers universais T7 e SP6. O gel de agarose a 1% foi corado com *Gel Red* e o marcador de 100 pB foi utilizado para mensurar o tamanho do fragmento.

As sequências obtidas para *B. atrox* foram nomeadas At.PLI1 e At.PLI2 e as de *M. lemniscatus*, Mi.PLI1 e Mi.PLI2. Por se tratar de serpentes de famílias diferentes (Viperidae e Elapidae), as os dados foram avaliados separadamente por ferramentas de bioinformática.

No programa *BLASTn*, observou-se que as sequências nucleotídicas At. PLI1 e 2, são similares às de *B. moojeni* e *B. jararacussu* do trabalho de Estevão Costa e colaboradores (2008), *B. alternatus* (Santos-Filho et al., 2011), *Lachesis muta* (Fortes-Dias et al., 2003), com identidade de 98% (Tabela 5). Uma sequência de cada espécie com identidade acima de

90% e *E-value* de 0.0 (quanto mais baixo indica maior semelhança entre as sequências) foi selecionada para as análises. Os dados da busca de segmentos de sequências homólogas (*Score*) mostram que a *B. moojeni* é a sequência mais semelhante às identificadas nesse estudo (Tabela 5).

**Tabela 5. Análise comparativa entre as sequências At.PLI1 e At.PLI2 pelo programa BLASTn.**

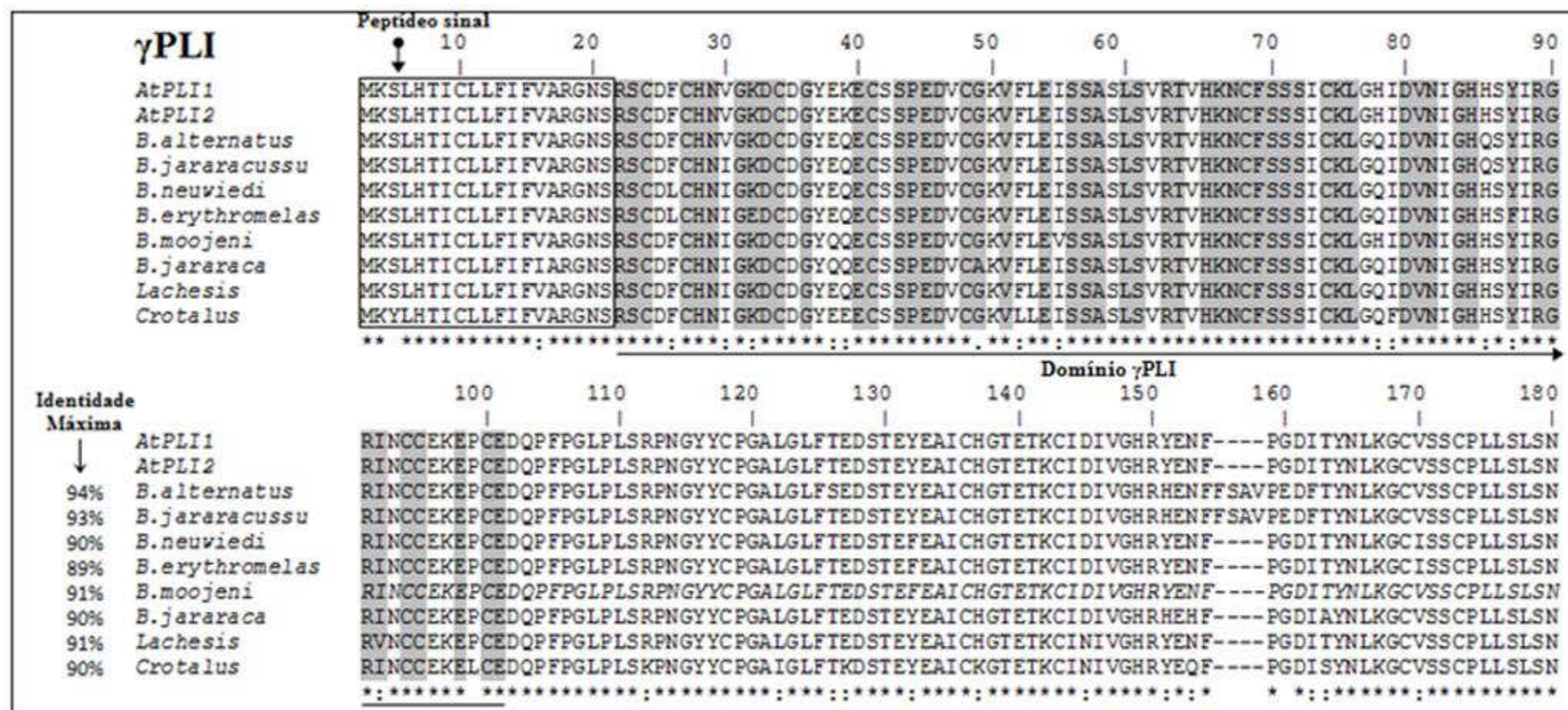
Identificação	Espécie	Classe	Score	Similaridade	Gaps	E-value
EU155175	<i>B. moojeni</i>	$\gamma$	1057	98%	0%	0.0
EU155173	<i>B. jararacussu</i>	$\gamma$	1051	98%	0%	0.0
EU155166	<i>B. alternatus</i>	$\gamma$	1046	98%	0%	0.0
AY425346	<i>Lachesis muta muta</i>	$\gamma$	1046	98%	0%	0.0
EU155170	<i>B. jararaca</i>	$\gamma$	1018	97%	0%	0.0
CDU08289	<i>Crotalus d. terrificus</i>	$\gamma$	963	95%	0%	0.0
EU155168	<i>B. erythromelas</i>	$\gamma$	957	95%	2%	0.0
EU155177	<i>B. neuwiedi</i>	$\gamma$	946	95%	2%	0.0
AB018372	<i>Gloydius b. siniticus</i>	$\gamma$	935	95%	0%	0.0
AB003472	<i>T. flavoviridis</i>	$\gamma$	857	93%	0%	0.0
AB559508	<i>P. elegans</i>	$\gamma$	852	93%	0%	0.0

\*Os dados quanto aos inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub> foram selecionados por espécie, sendo escolhida uma sequência de cada para as análises realizadas. O programa comparou as sequências do estudo com outras depositadas no Genbank.

O alinhamento múltiplo de nucleotídeos confirmou a similaridade entre as sequências. As sequências deduzidas de aminoácidos foram obtidas pelo programa *ORF Finder* (para maiores informações sobre o sequenciamento e predição de aminoácidos, consultar os anexos).

Esses dados foram utilizados para a pesquisa de similaridade contra o banco de dados do Genbank e os domínios conservados foram investigados pelo *BLASTp*. O algoritmo pesquisou por similaridade local em sequências de proteínas e domínios conservados em todos os bancos de dados não redundantes, onde está integrado o *Protein Data Bank*, *Swiss Prot*, *Protein Information Resource*, entre outros. As sequências At.PLI1 e At.PLI2 possuem similaridade às do domínio tridactilo de  $\gamma$ PLIs, que estão presentes também em receptores de ativador de plasminogênio tipo urocinase (u-PAR) e nos antígenos de superfície celular da superfamília Ly-6 e CD59 (Figura 17). Esses resultados corroboraram com os trabalhos de Ohkura et al., (1994), Fortes Dias et al., (2003), Estevão Costa et al., (2008), Oliveira (2009), Santos Filho et al., (2011) e So et al., (2011). Adicionalmente, alguns parâmetros físico-químicos foram analisados pela ferramenta *PROTParm* (ponto isoeletrico e massa molecular). Os dados da possível proteína de  $\gamma$ PLI de *B. atrox* (At.PLI $\gamma$ ) demonstra semelhança ao das demais espécies utilizadas na análise comparativa (Tabela 6).





**Figura 17.** Alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos pelo programa *ClustalW*. Na figura é demonstrado o percentual de identidade entre as sequências de *B. atrox* identificadas no estudo e de outras oito espécies de serpentes. Estão destacados o domínio tridactilo de receptores de plasminogênio tipo urocinase (u-PAR), o peptídeo sinal. Ao lado da identificação de espécies é demonstrada a identidade máxima obtida pela análise com *BLASTp*.

**Tabela 6. Características bioquímicas do inibidor de fosfolipases A<sub>2</sub> de *B. atrox* comparada com de outras serpentes.**

Inibidor	Identificação	Nº de aa	Massa molecular (Da)	Ponto isoelétrico (pI)
At. PLI1	-	200	22196.2	5.97
At. PLI2	-	200	22180.2	5.97
<i>B. moojeni</i>	ABV91335.1	200	22181.1	5.97
<i>B. jararacussu</i>	ABV91332.1	200	22178.1	5.79
<i>B. alternatus</i>	ABV91326.1	200	22208.1	5.79
<i>L. muta muta</i>	P60592.1	200	22207.1	5.97
<i>B. jararaca</i>	ABV91331.1	200	22197.1	6.04
<i>C. d. terrificus</i>	Q90358.1	200	22267.4	6.07
<i>B. erythromelas</i>	ABV91328.1	200	22281.1	5.24
<i>B. neuwiedi</i>	ABV91336.1	200	22266.1	5.50

As sequências Mi.PLI1 e 2 apresentaram divergência quanto à classe de inibidor na busca por homologia. Curiosamente, as cinco sequências que apresentavam maior identidade (89 a 91%) eram de inibidores registrados no *Genbank* como  $\alpha$ PLI e apenas duas indicavam semelhança com o tipo  $\gamma$  (Tabela 7). A tradução deduzida das trincas nucleotídicas foi utilizada para o alinhamento múltiplo e investigação do domínio conservado, conforme a metodologia descrita para *B. atrox* (Anexos). Novamente, a busca resultou na similaridade com sequências de PLIs dos tipos  $\alpha$  e  $\gamma$  (Tabela 8). Observou-se no registro do *Genbank* que as cinco sequências de  $\alpha$ PLI pertencem ao mesmo grupo de pesquisadores e constam como não publicadas até o momento, não sendo possível investigar o tipo de análise utilizada para tal definição. Por esse motivo, as sequências de  $\gamma$ PLI de serpentes brasileiras que apresentavam menor homologia (65 a 68%) foram incluídas nas análises. O presente estudo pode sugerir que o alinhamento realizado pelos grupos Sekulorski e colaboradores (2000), e Hains e colaboradores (2001) precisa ser reanalisado por técnicas mais modernas de sequenciamento.

**Tabela 7. Análise das sequências Mi.PLI1 e 2.**

Identificação	Espécie	Classe	Similaridade	Score	Gaps	E-value
<b>AF211165</b>	<i>O. scutellatus</i>	$\alpha$	91%	813	0%	0.0
<b>AF211161</b>	<i>Notechis ater</i>	$\alpha$	91%	808	0%	0.0
<b>AJ249829</b>	<i>Notechis scutatus</i>	$\alpha$	90%	797	0%	0.0
<b>AF211167</b>	<i>O. microlepidotus</i>	$\alpha$	90%	785	0%	0.0
<b>AF211166</b>	<i>P. textilis</i>	$\alpha$	89%	769	0%	0.0
<b>AB462512</b>	<i>E. climacophora</i>	$\gamma$	89%	756	0%	0.0
<b>AB021425</b>	<i>E. quadrvirgata</i>	$\gamma$	88%	745	0%	0.0

A pesquisa por domínios conservados mostrou que Mi.PLI1 e 2 possuem os resíduos de cisteína repetidos em série do domínio tridactilo ( $\gamma$ PLI) e não o de reconhecimento de

carboidratos (CRD) de lectinas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (família CTLD), característico em  $\alpha$ PLI (Anexos). As sequências similares registradas como  $\alpha$ PLI foram analisadas e também apresentaram similaridade com o domínio de  $\gamma$ PLIs.

No alinhamento múltiplo a semelhança entre os transcritos e as sequências do *Genbank* foi verificada, e as regiões do domínio conservado foram identificadas. Observou-se que existe similaridade entre as sequências registradas como  $\alpha$ PLIs e  $\gamma$ PLIs. Além disso, é notado que as sequências de Elapídeos possuem regiões bem conservadas diferentes daquelas de *Bothrops*. Em alguns desses locais as sequências de Mi.PLI são similares somente aos elapídicos, e em outros aos botrópicos (Figura 18). Por último, uma sequência do CTLD de *B. jararacussu* escolhida aleatoriamente no *Genbank* foi alinhada à de Mi.PLI e não houve similaridade (Anexos). As sequências que estão registradas no *Genbank* como  $\alpha$ PLIs (Tabela 8) possivelmente são aquelas referidas como  $\gamma$ PLIs de Elapídeos na Tabela 3, pois não existem publicações dessas espécies em  $\alpha$ PLIs até o momento. Os trabalhos sobre os  $\gamma$ PLI da Tabela 8 já foram publicados por Estevão Costa (2008, submetido ao *Genbank* em 2009) e Shirai e colaboradores (2009).

A predição de dados virtual sobre a estrutura quaternária do Mi.PLI $\gamma$  mostrou que a molécula possivelmente terá aspectos físico-químicos semelhantes aos de outras espécies (Tabela 9). Análises filogenéticas e de evolução, elucidação virtual das estruturas proteicas, expressão recombinante e ensaios de caracterização são previstos utilizando as informações de At.PLI $\gamma$  e Mi.PLI $\gamma$  identificados no presente estudo.

Tabela 8. Similaridade das sequências utilizadas para análise do inibidor de *M. lemniscatus*.

Classe	Família	Espécie	Identificação	Identidade máxima (%)	Referência
$\alpha$	Elapidae	<i>Notechis ater</i>	AAF23778	85%	Sekuloski <i>et al.</i> , 2000
		<i>Pseudonaja textilis</i>	AAF23783	82%	Sekuloski <i>et al.</i> , 2000
		<i>Notechis scutatus</i>	CAB56617	82%	Hains <i>et al.</i> , 2001
		<i>Oxyuranus scutellatus</i>	AAF23781	83%	Sekuloski <i>et al.</i> , 2000
		<i>Oxyuranus microlepdotus</i>	AAF23785	81%	Sekuloski <i>et al.</i> , 2000
$\gamma$	Elapidae	<i>Elaphe climacophora</i>	BAH47550	82%	Shirai <i>et al.</i> , 2009
	Viperidae	<i>Bothrops moojeni</i>	ABV91335	68%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009
		<i>Bothrops jararaca</i>	ABV91331	68%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009
		<i>Bothrops alternatus</i>	ABV91326	68%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009
		<i>Bothrops jararacussu</i>	ABV91333	67%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009
		<i>Bothrops neuwiedi</i>	ABV91336	66%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009
		<i>Bothrops erythromelas</i>	ABV91328	65%	Estevao-Costa <i>et al.</i> , 2009





**Tabela 9.** Características bioquímicas do inibidor de Fosfolipases A<sub>2</sub> de *M. lemniscatus* comparada com de outras serpentes.

<b>Inibidor</b>	<b>Massa molecular (Da)</b>	<b>Ponto isoelétrico (pI)</b>
<b>Mi. PLI1</b>	20592.5	5.77
<b>Mi. PLI2</b>	20691.6	5.90
<i>Notechis ater</i>	20861.7	6.13
<i>P. textilis</i>	20736.6	6.29
<i>N.scutatus</i>	20839.5	5.47
<i>O. scutellatus</i>	20928.6	5.61
<i>O. microlepidotus</i>	20924.6	5.71
<i>E. climacophora</i>	20937.6	5.65
<i>B. moojeni</i>	20625.2	5.81
<i>B. jararaca</i>	20641.3	5.89
<i>B. alternatus</i>	20780.4	5.61
<i>B. jararacussu</i>	20804.5	5.61
<i>B. neuwiedi</i>	20703.3	5.46
<i>B. erythromelas</i>	20718.3	5.20

## 2. CONCLUSÃO

O veneno da *B. bilineata* possui grande quantidade de fosfolipases A<sub>2</sub>, demonstrada pelos resultados da atividade fosfolipásica, que podem ser as responsáveis pelas lesões musculares intensas observadas nos ensaios de miotoxicidade desse estudo.

As fosfolipases A<sub>2</sub> presentes no veneno da *B. bilineata* têm como substrato preferencial a fosfatidilcolina, mas são capazes de hidrolisar outros fosfolipídios como ácido fosfatídico, em atividade específica decrescente, respectivamente.

O pH ótimo dessas PLA<sub>2s</sub> está no intervalo de 7 e 11.

O Ca<sup>2+</sup> é o principal cofator para a atividade fosfolipásica, porém, não é o que possui melhor afinidade pelo sítio catalítico.

A metodologia utilizada para fracionamento das PLA<sub>2s</sub> foi considerada exitosa. A fração isolada BiliTX-7 demonstrou atividade catalítica intensa, característico de fosfolipases do tipo Asp 49.

A eletroforese bidimensional mostra a existência de isoformas de fosfolipases A<sub>2</sub> que deve ser devido à glicosilação clássica dessas moléculas.

A metodologia aplicada na amplificação do material genético do tecido hepático das serpentes *B. atrox* e *M. lemniscatus*, mostrou-se eficiente para a identificação dos transcritos de inibidores de fosfolipases A<sub>2</sub>.

A presença de inibidores de classe  $\gamma$  ficou comprovada em ambas as espécies estudadas, como homologias de 98% ou maior, respectivas nas espécies comparadas: *B. atrox*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *L. muta muta*.

As sequências de *M. lemniscatus* apresentam características particulares de semelhança com outras elapídicas ou botrópicas em locais conservados. A maior similaridade dessa espécie com outras é de 85%, menor do que a de *B. atrox*.

Os dados obtidos em nosso trabalho mostrou que os inibidores são do tipo  $\gamma$  e não do tipo  $\alpha$ , conforme publicado por Sekuloski e colaboradores (2000), Hains e colaboradores (2001) e anotados no *Genbank*.

As predições virtuais sobre a estrutura quaternária da proteína que será produzida por expressão recombinante, mostrou dados semelhantes aos de outros já publicados, auxiliando na continuidade do estudo.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBATE R.; CIONI G.; RICCI I.; MIRANDA M.; GORI A.M. Thrombosis and Acute coronary syndrome. **Thrombosis Research**. V. 129, p. 235–240, 2012.
- ALTSCHUL S. F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER A. A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**. V. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRILAO-ESCARSO, S. H., SOARES, A. M., FONTES, M. R. M., FULY, A. L., CORREA, F. M. A., ROSA, J. C., GREENE, L. J., GIGLIO, J. R.. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**. v.4, p.723-732, 2002.
- AVILA - PIRES, T. C. S.; HOOGMOED, M. S & VITT, L. J. Herpetofauna Amazônica. Herpetologia no Brasil II. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**, p.13 – 43, 2007.
- AZEVEDO-RAMOS C.; GALATTI, U. Patterns of amphibian diversity in Brazilian Amazonia: conservation implications. **Biol. Conservation**, V. 103: 103-111, 2002.
- BERNARDE P. S.; ALBURQUEQUE S.; TURCI L. C. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos em Rondônia. **Anolis Books Editora**, 1ª edição, 2012.
- BERNARDE P. S.; COSTA H. C.; MACHADO R. A.; SÃO-PEDRO V. A. *Bothriopsis bilineata bilineata* (Wied, 1821) (Serpentes: Viperidae): New records in the states of Amazonas, Mato Grosso and Rondônia, northern Brazil. **Check List** , V. 7 p. 3, 2011.
- BERNARDE P. S.; GOMES J. O. Serpentes peçonhentas e ofidismo em Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, Estado do Acre. **Brasil**, V. 42, p. 65 – 72, 2012.
- BERNILS R. S., COSTA H. C. Lista de répteis da Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: [http:// www.sbherpetologia.org.br/lista\\_repteis](http://www.sbherpetologia.org.br/lista_repteis), acessado em 28 de setembro de 2012.
- BIARDI J.E.; HO C.Y.L.; MARCINCZYK J.; NAMBIAR K.P. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera. **Toxicon**, v. 58; p. 486–493, 2011.
- BILLAH MM, LAPETINA EG, CUATRECASAS P. Phospholipase A<sub>2</sub> and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca<sup>2+</sup> requirement, pH dependence, and cellular localization. **J Biol Chem**. V. 255, p. 10227-31, 1980.
- BORDON KC, PERINO MG, GIGLIO JR, ARANTES EC. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**. V. 94, p. 2740-8, 2012.
- BRADFORD, M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem**. v.72, p.248-254, 1976.

BRAND G. D; SALBO R.; JORGENSEN T. J. D.; BLOCH C. J; ERBA E. B.; ROBINSON C. V.; TANJONI I.; MOURA-DA-SILVA A. M.; ROEPSTORFF P.; DOMONT G. B.; PERALES J.; VALENTIN. H.; NEVES-FERREIRA A. G. C. The interaction of the antitoxin DM43 with a snake venom metalloproteinase analyzed by mass spectrometry and surface Plasmon resonance. *Journal of Mass Spectrometry*, V. 47, p. 567-573, 2012.

BRASIL (MINISTÉRIO DA SAÚDE). Óbitos por acidentes por animais peçonhentos. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. Disponível em:[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela\\_obitos\\_2000\\_2011\\_obitos\\_01\\_04\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_obitos_2000_2011_obitos_01_04_2011.pdf), acessado em 20/11/2012.

CAI Q.; ZHAO Z.; ANTALIS C.; YAN L.; PRIORE G. D.; A. H. HAMED; STEHMAN F. B.; SCHILDER J. M.; XU Y. Elevated and secreted phospholipase A<sub>2</sub> activities as new potential therapeutic targets in human epithelial ovarian cancer. **The FASEB Journal**, v. 26, p. 3306 – 3320, 2012.

CALDWELL, J. P. Diversity of Amazonian anurans: The role of systematics and phylogeny in identifying macroecological and evolutionary patterns. **A. C. Gibson**. V. 1, p. 73-88, 1996.

CALDWELL, J. P.; LIMA, A. P. A new Amazonian species of *Colostethus* with a nidicolous tadpole. **Herpetologica**, V. 59, p. 218-233., 2003.

CALVETE J. J.; JUAREZ P.; SANZ L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.** V. 42, p. 1405–1414, 2007.

CALVETE JJ. Venomomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **J. Proteomics**. V. 72, p. 121-126, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Latin América. Comstock. **Cornell University Press**, V.34 . p. 870, 2004.

CAMPOS L.B ; PUCCA M.B.; RONCOLATO E.C.; NETTO J.C.; BARBOSA J.E. Analysis of phospholipase A<sub>2</sub>, L-amino acid oxidase, and proteinase enzymatic activities of the *Lachesis muta rhombeata* venom. **J Biochem Mol Toxicol**. V. 26, p.8, 2012.

CARDOSO KC, DA SILVA MJ, COSTA GG, TORRES TT, DEL BEM LE, VIDAL RO, MENOSSI M, HYSLOP S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**. V. 26; p. 605, 2010.

CARRASCO P. A.; MATTONI C. I.; LEYNAUD G. C.; SCROCCHI G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American *Bothropoid pitvipers* (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 109–124, 2012.

CARREGARI V. C.; FLORIANO R. S.; RODRIGUES-SIMIONI L.; WINCK F. V.; BALDASSO P. A.; PONCE-SOTO L. A.; MARANGONI S. Biochemical, Pharmacological, and Structural Characterization of New Basic PLA<sub>2</sub> Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* Snake Venom. **BioMed Research International**, V.1, p. 12, 2013.

CARREGARI V. C. Caracterização bioquímica e estudo da atividade farmacológica no estudo da junção neuromuscular de uma fosfolipase A<sub>2</sub> isolada do veneno de *Bothriopsis*

*bilineata*. Dissertação de mestrado do Programa de Biologia funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas, 2011.

CASEWELL N. R.; HUTTLEY G. A.; WÜSTER W. Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles. **Nature communications**, V. 3, p.1066, 2012.

CINTRA A.C.O.; TONI L.G.B.; SARTIM M.A.; FRANCO J.J.; CAETANO R.C.; MURAKAMI M.T.; SAMPAIO S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, V. 60, p. 70–82, 2012.

COSTA T. R.; MENALDO D. L.; OLIVEIRA C. Z.; SANTOS-FILHO N. A.; TEIXEIRA S. S.; NOMIZO A.; FULY A. L.; MONTEIRO M. C.; DE SOUZA B. M.; PALMA M. S.; STÁBELI R. G.; SAMPAIO S. V.; SOARES A. M.. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**. V. 29, p. 1645-56, 2008.

COTRIM C. A.; OLIVEIRA S. C. B.; FILHO E. B. S. D.; FONSECA F. V.; BALDISSERA L.; ANTUNES E.; XIMENES R. M.; MONTEIRO H. S. A.; RABELLO M. M.; HERNANDES M. Z.; TOYAMA D. O.; TOYAMA M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A<sub>2</sub>. **Chemico-Biological Interactions**. V. 189, p. 9–16, 2011.

COULTHARD L. G.; COSTELLO J.; ROBINSON B.; SHIELS I. A.; TAYLOR S. M.; WOODRUFF T. M. Comparative efficacy of a secretory phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor with conventional anti-inflammatory agents in a rat model of antigen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, V. 13, p. 42, 2011.

COUTINHO-NETO A, CALDEIRA CA, SOUZA GH, ZAQUEO KD, KAYANO AM, SILVA RS, ZULIANI JP, SOARES AM, STÁBELI RG, CALDERON LA. ESI-MS/MS identification of a bradykinin-potentiating peptide from Amazon *Bothrops atrox* snake venom using a hybrid Qq-oaTOF mass spectrometer. **Toxins (Basel)**. V.18, p. 327-35, 2013.

CUNNINGHAM T. J.; SOUAYAH N.; JAMESON B.; MITCHELL J.; YAO L. Systemic Treatment of Cerebral Cortex Lesions in Rats with a New Secreted Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor. **Journal of neurotrauma**, V. 21, p. 1683–1691, 2004.

DENNIS E. A.; CAO J.; HSU Y.; MAGRIOTI V.; KOKOTOS G.; Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 6130–6185, 2011.

DHILLON D. J.; CONDREA L.; MARAGANORE J.; HEINRIKSON R.; BENJAMIN H.; ROSENBERG P.; Comparison of enzymatic and pharmacological activities of lysine-49 and aspartate-49 Phospholipases A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus* *Piscivorus* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, V. 36, p. 1723-1730, 1987.

DONNINI S.; FINETTI F.; FRANCESE S.; BOSCARO F.; DANI F. R.; MASET F.; FRASSON R.; PALMIERI M.; PAZZAGLI M., FILIPPIS DE P.; GARACI E.; ZICHE M. A novel protein from the serum of *Python sebae*, structurally homologous with type-γ phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, displays antitumour activity. **Biochem. J.** V. 440, p. 251 –262, 2011.

DUNN R. D.; BROADY K. W. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, V. 12, p. 1533, 2001.

ESTEVÃO-COSTA, M.I. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous g-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, p. 122–129, 2008.

FAURE G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**, V. 82, p. 833–840, 2000.

FEARNSIDE P. M. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. **Acta Amazônica**, v. 36, p. 395 – 400, 2006.

FEIO, R. N. & CARAMASCHI, U.. Contribuições ao conhecimento da herpetofauna do nordeste do estado de Minas Gerais, Brasil. **Phyllomedusa**, V. 1, 105-111, 2002.

FELICORI L. F.; SOUZA C. T.; VELARDE D. T.; MAGALHAES A.; ALMEIDA A. P.; FIGUEIREDO S.; RICHARDSON M.; DINIZ C. R.; SANCHEZ E. F.. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. **Protein Expression and Purification**, V. 30, p. 32– 42, 2003.

FELICORI L. F.; OLORTEGUI C. C.; SANCHEZ E. F. Specific identification of *Lachesis muta muta* snake venom using antibodies against the plasminogen activator enzyme, LV-PA. **Toxicon**, v. 45, p. 803–806, 2005.

FERRÃO M.; RODRIGUES FILHO J. A. S.; SILVA M. O. Checklist of reptiles (Testudines, Squamata) from Alto Alegre dos Parecis, southwestern Amazonia, Brazil. **Herpetology Notes**, V. 5, p. 473- 480, 2012.

FORTES-DIAS C. L.; LIN Y.; EWELL J.; DINIZ C. R.; LIU T. Y. A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J Biol Chem**. V. 269, p. 646-651, 1994.

FORTES-DIAS C.L.; BARCELLOS C.J.; ESTEVÃO-COSTA M.I. Molecular cloning of a g-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). **Toxicon**, v. 41, p. 909–917, 2003.

FORTES-DIAS, C.L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, V. 40, p. 481-484, 2002.

FOX JW. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**. V. 62, p.75-82, 2013.

FULY A. L.; CALIL-ELIAS S.; MARTINEZ A. M. B.; MELO P. A.; GUIMARÃES J. A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* snake venom Comparison with lysophosphatidylcholine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, V. 35, p. 1470–1481, 2003.

FULY A. L.; CALIL-ELIAS S.; ZINGALIA R. B.; GUIMARAES J. A.; MELO P. A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Toxicon**, V. 38, p. 961-972, 2000.

FULY A. L.; SOARES A. M.; MARCUSSI S.; GIGLIO J. R.; GUIMARÃES J. A.. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, V. 86, p. 731–739, 2004.

GASPAR D.; LÚCIO M.; ROCHA S.; LIMA J. L. F. C.; REIS S. Changes in PLA<sub>2</sub> activity after interacting with anti-inflammatory drugs and model membranes: evidence for the involvement of tryptophan residues. **Chemistry and Physics of Lipids**, V. 164, p. 292–299, 2011.

GENTILE M. T.; RECCIA M. G.; SORRENTINO P. P.; VITALE E.; SORRENTINO G.; PUCA A. A.; COLUCCI-D'AMATO L. Role of Cytosolic Calcium-Dependent Phospholipase A<sub>2</sub> in Alzheimer's Disease Pathogenesis. **Mol Neurobiol**, V. 45, p. 596–604, 2012.

GUTIÉRREZ J. M.; OWNBY C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. V. 15, p. 15-31, 2003.

HAGE-MELIM L. I. S.; SILVA C. H. T. P.; SEMIGHINI E. P.; TAFT C. A.; SAMPAIO S. V. Computer-aided Drug Design of Novel PLA<sub>2</sub> Inhibitor Candidates for Treatment of Snakebite. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, V. 27, p. 739-1102, 2009.

HAINS P. G.; SUNG K.L.; TSENG A.; BROADY K. W. Functional characteristics of a phospholipase A(2) inhibitor from *Notechis ater* serum. **J Biol Chem**. V. 275, p. 983-91, 2000.

HAINS P. G; BROADY K. W. Purification and inhibitory profile of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from Australian elapid sera. **Biochem J**. V. 346, p. 139-46, 2000.

HAINS P. G.; NIELD B.; SEKULOSKI S.; DUNN R.; BROADY K. Sequencing and Two-dimensional Structure Prediction of a Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from the Serum of the Common Tiger Snake (*Notechis scutatus*). **J. Mol. Biol**. V. 312, p. 875-884, 2001.

HOGUE A.R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae [Serpentes Viperidae]. **Memórias do Instituto Butantan**, V. 33, p. 109-184, 1966.

HOLZER, M., MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicon**. v.34, p.1149–1155, 1996.

INOUE S.; KOGAKI H.; IKEDA K.; SAMEJIMA Y.; OMORI-SATOH T. Amino Acid Sequences of the Two Subunits of a Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from the Blood Plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 266, p. 1001-1007, 1991.

KANG TS, GEORGIEVA D, GENOV N, MURAKAMI MT, SINHA M, KUMAR RP, KAUR P, KUMAR S, DEY S, SHARMA S, VRIELINK A, BETZEL C, TAKEDA S, ARNI



RK, SINGH TP, KINI RM. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.** V. 278, p. 4544-76, 2011.

KARABINA S.A.; GORA S.; ATOUT R.; NINIO E. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. **Biochimie.** V. 92, p. 594 - 600, 2010.

KARAKAS M.; KOENIG W. Lp-PLA<sub>2</sub> Inhibition - The Atherosclerosis Panacea? **Pharmaceuticals**, V. 3, p. 1360-1373, 2010.

KOGAKI H.; INOUE S.; IKEDA K.; SAMEJIMA Y.; OMORI-SATOH T.; HAMAGUCHI K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. **J Biochem.**, V.106, p. 966-71, 1989.

KOH C. Y.; KINI R. M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. **Toxicon**, V. 1, p. 1–10, 2011.

KOH D. C. I.; ARMUGAM A.; JEYASEELAN K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.** V. 63, p. 3030–3041, 2006.

LAMBEAU G.; GELB M. H. Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A<sub>2</sub>. **Annu. Rev. Biochem.** V. 77, p. 495-520, 2008.

LEÃO L. I. Análise transcriptômica das glândulas de veneno da *Micrurus corallinus* e identificação de candidatos antigênicos para um soro alternativo. Dissertação de mestrado do Programa de Ciências da Universidade de São Paulo, 2008.

LIZANO S.; ANGULO Y.; LOMONTE B.; FOX J. W.; LAMBEAU G.; LAZDUNSKI M.; GUTIERREZ J. M. Two phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **Biochem. J.**, v. 346, 631- 639, 2000.

LIZANO S.; DOMONT G.; PERALES J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, V. 42, p. 963–977, 2003.

LIZANO S.; LOMONTE B.; FOX J. W.; GUTIERREZ J. M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. J.** v. 326, 853-859, 1997.

LOMONTE B.; GUTIÉRREZ J. M. Phospholipases A<sub>2</sub> From Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage? **Acta Chim. Slov.**, V. 58, p. 647–659, 2011.

MARCON F, PURTELL L, SANTOS J, HAINS PG, ESCOUBAS P, GRAUDINS A, NICHOLSON GM. Characterization of monomeric and multimeric snake neurotoxins and other bioactive proteins from the venom of the lethal Australian common copperhead (*Austrelaps superbus*). **Biochem Pharmacol.** V. 13, p. 159, 2013.

MARCUSSI S.; SANT'ANA C. D.; OLIVEIRA C. Z.; RUEDA A. Q; MENALDO D. L.; BELEBONI R. O.; STABELI R. G.; GIGLIO J. R.; FONTES M. R. M.; SOARES A. M.

Snake Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p.743-756, 2007.

MARCUSSI S.; STÁBELI R. G.; SANTOS-FILHO N. A.; MENALDO D. L.; PEREIRA L. L. S.; ZULIANI J. P.; CALDERON L. A.; SILVA S. L.; ANTUNES L. M. G.; SOARES A. M. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, V. 65, p. 9–14, 2013.

MARKLAND FS. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, V. 36, p. 1749-1800, 1998.

MATSUI T, FUJIMURA Y, TITANI K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, V. 1477, p. 146-56, 2000.

MEIRELLES-FILHO, J. O livro de ouro da Amazônia: mitos e verdades sobre a região mais cobiçada do planeta. **Ediouro**, v. 1, p. 397, 2004.

MURAKAMI M.; TAKETOMI Y.; SATO H.; YAMAMOTO K. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> revisited. **J. Biochem**. V. 150, p. 233–255, 2011a.

MURAKAMI T, KAMIKADO N, FUJIMOTO R, HAMAGUCHI K, NAKAMURA H, CHIJIWA T, OHNO M, ODA-UEDA N. A [Lys<sup>49</sup>] phospholipase A<sub>2</sub> from *Protobothrops flavoviridis* venom induces caspase-independent apoptotic cell death accompanied by rapid plasma-membrane rupture in human leukemia cells. **Biosci Biotechnol Biochem**. V. 75, p. 864-70, 2011b.

NEIVA M, ARRAES FB, DE SOUZA JV, RÁDIS-BAPTISTA G, PRIETO DA SILVA AR, WALTER ME, BRIGIDO MDE M, YAMANE T, LÓPEZ-LOZANO JL, ASTOLFI-FILHO S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**. V. 53(4), p. 427-36, 2009.

NEPSTAD D.; VERÍSSIMO A.; MOUTINHO P.; NOBRE C. O empobrecimento oculto da floresta Amazônica. **Ciencia Hoje**, v. 27, p. 70-73, 2000.

NISHIDA M.; OKAMOTO M.; OHNO A.; OKUMURA K.; HAYASHI K.; IKEDA K.; INOUE S. Inhibitory activities of the heterotrimers formed from two  $\alpha$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitory proteins with different enzyme affinities and importance of the intersubunit electrostatic interaction in trimer formation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1804, p. 2121–2127, 2010.

NOBUHISA I.; DESHIMARU M.; CHIJIWA T.; NAKASHIMA K.; OGAWA T.; SHIMOHIGASHI Y.; FUKUMAKI Y.; HATTORI S.; KIHARA H.; OHNO M. Structures of genes encoding phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake. **Gene**, v. 191, p. 31–37, 1997.

NUNES D. C. O.; RODRIGUES R. S.; LUCENA M. N.; COLOGNA C. T.; OLIVEIRA A. C. S.; HAMAGUCHI A.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; ARANTES E. C.; TEIXEIRA D. N. S.; UEIRA-VIEIRA C.; RODRIGUES V. M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V. 154, p. 226–233, 2011.

OHKURA N.; INOUE S.; IKEDA K.; HAYASHI K. Isolation and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of the Thailand cobra *Naja naja kaouthia*. **Biochem Biophys Res Commun**. V. 29; p. 784-788, 1994.

OHKURA N.; OKUHARA H.; S. INOUE; IKEDA K; HAYASHI K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii sineticus*. **Biochem. J.**, V. 325, p. 527-531, 1997.

OHKURA N.; KITAHARA Y.; INOUE S.; IKEDA K.; HAYASHI K.; Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J Biochem**. V. 125, p. 375-82, 1999.

OKUMURA K.; INOUE S.; IKEDA K.; HAYASHI K. cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor PLIK from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffi sineticus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1441, p. 51-60, 1999.

OKUMURA K.; INOUE S.; IKEDA K.; K. HAYASHI. Identification of b-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 408, p. 124–130, 2002.

OLEKSOWICZ L.; LIU Y.; BRACKEN R. B.; GAITONDE K.; BURKE B., SUCCOP P.; LEVIN L.; DONG Z.; LU S. Secretory Phospholipase A<sub>2</sub>-IIa is a Target Gene of the HER/HER2-Elicited Pathway and a Potential Plasma Biomarker for Poor Prognosis of Prostate Cancer. **The Prostate**, v. 72, p.1140 - 1149 .2012.

OLIVEIRA C.Z.; MENALDO D.L.; MARCUSSI S.; SANTOS-FILHO N. A.; SILVEIRA L. B.; BOLDRINI-FRANÇA J.; RODRIGUES V. M.; SOARES A.M. An alpha-type phospholipase A(2) inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**. V., 90, p. 1506-1514, 2008.

PAULA V. J. R. Inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> e da proteína Tau em culturas primárias de neurônios hipocâmpais. Dissertação de Mestrado apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo na área de Psiquiatria, 2009.

PERALES J, VILLELA C, DOMONT GB, CHOUMET V, SALIOU B, MOUSSATCHÉ H, BON C, FAURE G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **Eur J Biochem**. V. 227, p. 19-26, 1995.

PORTO B. N.; TELLI C. A.; DUTRA T. P.; ALVES L. S.; BOZZA M. T.; FIN C. A.; THIESEN F. V.; RENNER M. F. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**. V. 50. p. 270- 277, 2007.

PRESKORN S. H.; HATT C. R. How Pharmacogenomics (PG) Are Changing Practice: Implications for Prescribers, Their Patients, and the Healthcare System (PG Series Part I). **J Psychiatr Pract**. V. 19, p. 142-9, 2013.

QIAO L.; TOBOLKINA E.; LIU B.; GIRAULT H.H. Coupling Isoelectric Focusing Gel Electrophoresis to Mass Spectrometry by Electrostatic Spray Ionisation. **Anal Chem**. 2013.

QUIRÓS S.; ALAPE-GIRÓN A.; ANGULO Y.; LOMONTE B. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new  $\alpha$ -type phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. Reptiles of Latin America, 2007.

RODRIGUES R. S.; IZIDORO L. F.; TEIXEIRA S. S.; SILVEIRA L. B.; HAMAGUCHI A.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO H. S.; GIGLIO J. R.; FULY A. L.; SOARES A. M.; RODRIGUES V.M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. V. 50, p. 153-65, 2007.

RODRIGUES-SIMIONI L.; FLORIANO R. S.; ROSTELATO-FERREIRA S.; SOUSA N. C.; MARANGONI S.; PONCE-SOTO L. A.; CARREGARI V. C.; HYSLOP S. Presynaptic action of *Bothriopsis bilineata smargadina* (forest viper) venom in vitro. **Toxicon**, v. 58, p. 140–145, 2011.

ROLDÁN SCHILLING V, VICENTE GARCÍA V. Pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. Mechanism of action of the new oral anticoagulants. **Med Clin (Barc)**. V.139 p.10-2, 2012.

ROSENSEN; HURT-CAMEJON R.S. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibition and atherosclerotic vascular disease: prospects for targeting secretory and lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Current Opinion in Lipidology**, v. 21, p. 473 –480, 2010.

RUEDA A. Q.; RODRÍGUEZ I. G.; ARANTES E. C.; SETÚBAL S. S.; CALDERON L. A.; ZULIANI J. P.; STÁBELI R. G.; SOARES A. M. Biochemical Characterization, Action on Macrophages, and Superoxide Anion Production of Four Basic Phospholipases A<sub>2</sub> from Panamanian *Bothrops asper* Snake Venom. **BioMed Research International**, V. 9, p. 789-689, 2013.

SADARIA M. R.; MENG X.; FULLERTON D. A.; REECE T. B.; SHAH R. R.; F. L. GROVER, WEYANT M. J. Secretory Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibition Attenuates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Human Esophageal Adenocarcinoma Cells. **Ann Thorac Surg**, v. 91, p. 1539–45, 2011.

SAMY R. P.; GOPALAKRISHNAKONE P.; CHOW V. T. K. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Bioinformation**, v. 8(1), p. 048-057, 2012.

SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biochemistry**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS J. I.; CARDOSO F. F.; SOARES A. M.; SILVA M. P.; GALLACCI M.; FONTES M. R. M. Structural and Functional Studies of a Bothropic Myotoxin Complexed to Rosmarinic Acid: New Insights into Lys49-PLA2 Inhibition. **PLoS ONE**, V. 6, p. 12, 2011.

SANTOS-FILHO N. A.; FERNANDES C. A. H.; MENALDO D. L.; MAGRO A. J.; FORTES-DIAS C. L.; ESTEVÃO-COSTA M. I.; FONTES M. R. M.; SANTOS C. R.; MURAKAMI M. T.; SOARES A. M. Molecular cloning and biochemical characterization of

a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, V. 93, p. 583- 592, 2011.

SANTOS-FILHO N. A.; SILVEIRA L. B.; OLIVEIRA C. Z.; BERNARDES C. P.; MENALDO D. L.; FULY A. L.; ARANTES E. C.; SAMPAIO S. V.; MAMEDE C. C. N.; BELETTI M. E.; OLIVEIRA F.; SOARES A. M.. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, V. 52, p. 908–917, 2008.

SBH – SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. Brazilian reptiles-List of species. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br>, acessado em 15 de dezembro de 2012.

SCHALOSKE R. H., DENNIS E. A., **Biochim. Biophys Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SEILER S. M.; PELUSO M.; MICHEL I. M.; GOLDENBERG H.; FENTON J. W.; RIEXINGERO D.; NATARAJANO S. Inhibition of thrombin and sflr peptide stimulation of platelet aggregation, phospholipase A<sub>2</sub> and NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by a thrombin receptor antagonist. **Pergamon**, V. 49, p. 519-528, 1994.

SHIMADA A.; OHKURA N.; HAYASHI K.; SAMEJIMA Y.; OMORI-SATOH T.; INOUE S.; IKEDA K. Subunit structure and inhibition specificity of a-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*. **Toxicon**, V. 57, p. 787–796, 2008.

SHIRAI R, TORIBA M, HAYASHI K, IKEDA K, INOUE S. Identification and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**. V. 53, p. 685-692, 2009.

SILVEIRA L. B. Caracterização estrutural e funcional de uma nova fosfolipase A<sub>2</sub> ácida de *Bothrops moojeni*. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP, 2011.

SILVEIRA L. B.; MARCHI-SALVADOR D. P.; SANTOS-FILHO N. A.; SILVA JR F. P.; MARCUSSI S.; FULY A. L.; NOMIZO A.; SILVA S. L.; STÁBELI R. G.; ARANTES E. C.; SOARES A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, V. 73, p. 35– 43, 2013.

SLAIS K, HORKÁ M, KARASEK P, PLANETA J, ROTH M. Isoelectric Focusing in Continuously Tapered Fused Silica Capillary Prepared by Etching with Supercritical Water. **Anal Chem**. 2013.

SMART B. P.; PAN Y. H.; WEEKS A. K.; BOLLINGER J. G. BAHNSON B. J.; GELB M. H. Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub> by indole analogues: a structure-guided study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 12 1737–1749, 2004.

SO S.; CHIIWA T.; IKEDA N.; NOBUHISA I.; ODA-UEDA N.; HATTORI S.; OHNO M. Identification of the B Subtype of c-Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitor from *Protobothrops*

*flavoviridis* Serum and Molecular Evolution of Snake Serum Phospholipase A<sub>2</sub> Inhibitors. **J Mol Evol**, v. 66, p. 298–307, 2008.

SO S.; MURAKAMI T.; IKEDA N.; CHIJIWA T.; ODA-UEDA N.; KURAISHI T.; HATTORI S.; OHNO M. Identification and evolution of venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from *Protobothrops elegans* serum. **Biosci Biotechnol Biochem**. V. 75, p. 480-488, 2011.

SOARES A. M.; MARCUSSI S.; STABELI R. G.; FRANCA S. C.; GIGLIO J. R.; WARD R. J.; ARANTES E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, V. 302, p. 193–200, 2003.

SOARES A. M.; GIGLIO J. R. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, V. 42, p. 855–868, 2003.

SOARES A. M.; TICLI F. K.; MARCUSSI S.; LOURENÇO M.V.; JANUÁRIO A. H.; SAMPAIO S. V.; GIGLIO J. R.; LOMONTE B.; PEREIRA P. S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Curr Med Chem**. V. 12, p. 2625 – 2641, 2005.

SOUZA C. A.; KAYANO A. M.; SETÚBAL S. S.; PONTES A. S.; FURTADO J. L.; KWASNIEWSKI F. H.; ZAQUEO K. D.; SOARES A. M.; STÁBELI R. G.; ZULIANI J. P. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. **J Venom Res**. V. 25, p. 28-34, 2012.

SOUZA D. L. N.; GOMES M. S. R.; FERREIRA F. B.; RODRIGUES R. S.; ACHÊ D. C.; RICHARDSON M.; BORGES M. H.; RODRIGUES V. M.. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V. 161, p. 102–109, 2012.

SOUZA R. C. G. A Rare Accident, **Bull. Chicago Herp. Soc.**, V. 42, p. 161-163, 2007.

SOUZA, M. B. Diversidade de anfíbios nas unidades de conservação ambiental: Reserva Extrativista do Alto Juruá (REAJ) e Parque Nacional da Serra do Divisor (PNSD), Acre, Brasil. **Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista-Unesp**, Rio Claro, SP, 2002.

SRIBAR, A. J. KRIZAJ I. Secreted Phospholipases A<sub>2</sub> – not just Enzymes. **Acta Chim. Slov**. V. 58, p. 678–688, 2011.

STÁBELI R. G.; AMUI S. F.; SANT'ANA C. D.; PIRES M. G.; NOMIZO A.; MONTEIRO M. C.; ROMÃO P. R. T.; GUERRA-SÁ R.; VIEIRA C. A.; GIGLIO J. R.; FONTES M. R. M.; SOARES A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**, V. 142, p. 371–381, 2006.

TABARELLI, M.; GASCON C. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. **Megadiversidade**, v. 1, p. 181-188, 2005.

TEIXEIRA S. S.; SILVEIRA L. B.; SILVA F. M. N.; MARCHI-SALVADOR D. P.; SILVA JR F. P.; IZIDORO L. F. M.; FULY A. L.; JULIANO M. A.; SANTOS C. R.; MURAKAMI M. T.; SAMPAIO S. V.; SILVA S. L.; SOARES A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch Toxicol**, V. 85, p. 1219–1233, 2011.

THWIN M.; SATISH R. L.; CHAN S. T. F.; GOPALAKRISHNAKONE P. Functional site of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from python serum, Phospholipase A<sub>2</sub> binding and anti-inflammatory activity. **Eur. J. Biochem.**, V. 269, p. 719-727, 2002.

THWIN M. M.; GOPALAKRISHNAKONE P.; KINI R. M.; ARMUGAM A.; JEYASEELAN K. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A<sub>2</sub> inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**. V. 39, p. 9604-9611, 2000.

TORREZ P. Q.; DUARTE M. R.; FRANÇA F. O. S.; FIGUEIREDO L.; P. ABATI; L. R. CAMPOS; P. P. O. PARDAL; M. QUIROGA; M. MASCHERETTI; M. BOULOS. First report of an accident with the speckled forest pit viper (*Bothriopsis taeniata*) in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V. 42, p. 342-344, 2009.

UETZ, P. **Coluber, The Reptile Database**. Disponível: <http://www.reptile-database.org.>, acessado em 20 de novembro de 2012.

VALENTE RH, GUIMARÃES PR, JUNQUEIRA M, NEVES-FERREIRA AG, SOARES MR, CHAPEAUROUGE A, TRUGILHO MR, LEÓN IR, ROCHA SL, OLIVEIRA-CARVALHO AL, WERMELINGER LS, DUTRA DL, LEÃO LI, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IL, HO PL, ZINGALI RB, PERALES J, DOMONT GB. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J Proteomics**. V. 72, p. 241-55, 2009.

VITT L. J. Communities. Snakes: Ecology and evolutionary biology. **R. A. Seigel, J. T. Collins & S. S. Novak** (eds.), p. 335 - 365, 1987.

VITT, L. J. Biodiversity of Amazonian lizards. Neotropical Biodiversity and Conservation. Mildred E. Mathias Botanic Garden Miscellaneous Publication, **A. C. Gibson (Ed.)**. V 1, p. 89-108, 1996.

VOGT, R. C.; MOREIRA, G.; DUARTE, A. C. O. C. Biodiversidade de répteis do bioma floresta Amazônica e Ações prioritárias para sua conservação. **J. P. R. Capobianco. (Org.)**. p.89-96, 2001.

VONK F. J.; JACKSON K.; DOLEY R.; MADARAS F.; MIRTSCHEIN P. J.; VIDAL N. Snake venom: From fieldwork to the clinic, Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high throughput screening of venom, bring new hope for drug Discovery. **Bioessays**, V. 33, p. 269–279, 2011.

WALDEZ F.; VOGT R. C. Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio Purus, Amazonas, Brasil. **Acta amazônica**, V. 39, p. 681 – 692, 2009.

WIED N. Beiträge zur Naturgeschichte von Brasilien. **Weimar**, v. 1, p. 612, 1825.

WUSTER W.; SALOMAO M. G.; QUIJADA-MASCARENAS J. A.; THORPE R. S. BBBSP. Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. **Biology of the Vipers**, V. 31, p. 111–129, 2002.

ZELANI A.; ANDRADE-SILVA D.; ROCHA M. M.; FURTADO M. F.; SERRANO S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. L. M.; HO P. L. A Transcriptomic View of the Proteome Variability of Newborn and Adult *Bothrops jararaca* Snake Venoms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, V. 6, p. 1554, 2012.

ZULIANI J. P.; FERNANDES C. M.; ZAMUNER S. R.; GUTIERREZ J. M.; TEIXEIRA C. F. P.. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, V. 45, p. 335–346, 2005.



## 8. ANEXOS

### 8.1 ALINHAMENTO MÚLTIPLO DE AT.PLI1 E AT.PLI2

	10	20	30	40	50	60	70	80
AtPLI1	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGGTCATGTGACTTTTGTACAA							
AtPLI2	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGGTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>C.d.terrif</i>	ATGAAATATCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>L. mutamut</i>	ATGAAATATCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. moojeni</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. jararacu</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. erythro</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. neuwied</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. alterna</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>B. jararaca</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>G.b.siniti</i>	ATGAAATCTCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCATAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTATTGTACAA							
<i>T. flavovi</i>	ATGAAATCTCTACACATCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
<i>P. elegans</i>	ATGAAATCTCTACACATCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTACAA							
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	90	100	110	120	130	140	150	160
AtPLI1	CGTAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAAAAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
AtPLI2	CGTGGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAAAAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>C.d.terrif</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAAGAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>L. mutamut</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAAGAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>B. moojeni</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACCAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGGCTCT							
<i>B. jararacu</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTC							
<i>B. erythro</i>	CATAGGAGAAGATTGCGATGGTTACGAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>B. neuwied</i>	CGTAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>B. alterna</i>	CGTAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>B. jararaca</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACCAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>G.b.siniti</i>	CATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACGAACAGGAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>T. flavovi</i>	CATAGGAGCAGATTGCGAAGGTTTCCAACATGAATGTTCTCTCCAGAAGATGAATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGATTT							
<i>P. elegans</i>	CATAGGAGCAGATTGCGAAGGTTTCCAACATGAATGTTCTCTCCAGAAGATGAATGTGGCAAGGCTTCTCTGGAGCTTT							
	* * *	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	170	180	190	200	210	220	230	240
AtPLI1	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
AtPLI2	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>C.d.terrif</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>L. mutamut</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. moojeni</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. jararacu</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. erythro</i>	CATCAGCATCGTTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. neuwied</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. alterna</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>B. jararaca</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>G.b.siniti</i>	CATCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAACTTGGGCACATTGATGTA							
<i>T. flavovi</i>	CGTCAGCATCGCTGTCAGTCCGAACGTGTGCACAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCGCTGCAAACTTAGGCACATTGATGTA							
<i>P. elegans</i>	CGTCAGCATCGCTGTCATTTTCAAGTGTGCACAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCGCTGCAAACTTAGGCACATTGATGTA							
	* * *	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	250	260	270	280	290	300	310	320
AtPLI1	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGG							
AtPLI2	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCTGTTTCCAGG							
<i>C.d.terrif</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGG							
<i>L. mutamut</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGG							
<i>B. moojeni</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGG							
<i>B. jararacu</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGG							
<i>B. erythro</i>	AATATTGGGCATCAATCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCGGG							
<i>B. neuwied</i>	AATATTGGGCATCAATCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCGGG							
<i>B. alterna</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCGGG							
<i>B. jararaca</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCGGG							
<i>G.b.siniti</i>	AATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAACCGTTTCCGGG							
<i>T. flavovi</i>	AATATTGGGCATGACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAATCGTTTCCGGG							
<i>P. elegans</i>	AATATTGGGCATGACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCCTGTGAAGACCAATCGTTTCCGGG							
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

	330	340	350	360	370	380	390	400
AtPLI1	ACTGCCCTCTCCAGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATTTGAAG							
AtPLI2	ACTGCCCTCTCCAGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATTTGAAG							
<i>C.d.terrif</i>	ACTGCCCTCTCCAAACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGTGCAATTGGCCTTTTACGAAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>L. mutamut</i>	ACTGCCCTCTCCAAAC -AAATGGATACTATTGCCCTGGCGCAATTGGCCTTTTACGAAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>*Continuação</i>								
<i>B. moojeni</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATTTGAAG							
<i>B. jararacu</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>B. erythro</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>B. neuwied</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTTCGGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>B. alterna</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGCCTTTTACAGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>B. jararaca</i>	ACTGCCCTCTCCCGACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCATTGGGACTTTTACGGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>G.b.siniti</i>	ACTGCCCTCTCCCAACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCGCACTTGGCCTTTTACGGAGGACAGCACTGAATATGAAG							
<i>T. flavovi</i>	ACTGCCCTCTCCAGCCAAATGGATACTATTGCCCTGGCTCATTAGGCCTTTTACAAAGGACAGCACTGAATTTGAAG							
<i>P. elegans</i>	ACTGCCCTCTCCCAACCAAAATGGATACTATTGCCCTGGCTCACTTGGCCTTTTACGAAGGACAGCACTGAATTTGAAG							
	*****	* *****	*****	** *	** *	*****	*	*****
	410	420	430	440	450	460	470	480
AtPLI1	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
AtPLI2	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>C.d.terrif</i>	CTATTTGCAAAGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTAAACATCGTGGGACACAGATATGAACAATT-----TCCTGGA							
<i>L. mutamut</i>	CCATTTGCAAAGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTAAACATCGTGGGACACAGATATGAACCATT-----TCCTGGA							
<i>B. moojeni</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>B. jararacu</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>B. erythro</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>B. neuwied</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>B. alterna</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>B. jararaca</i>	CTATTTGCCATGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTGACATCGTGGGACATAGACATGAACATTT-----TCCTGGA							
<i>G.b.siniti</i>	CTATTTGCAAAGGAAGTGAAGTGAAGTGCATTAAACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
<i>T. flavovi</i>	CTATCTGCAAAGGAACCGAGACTAAGTGCATTAAACATCGTGGGACACAGATATGAACATTT-----TCCTGGA							
<i>P. elegans</i>	CTATTTGCAAAGGAACCGAGACTAAGTGCATTAAACATCGTGGGACACAGATATGAAAATTT-----TCCTGGA							
	*** ** *	*****	*****	*****	*** ** *	*	*****	*** ** *
	490	500	510	520	530	540	550	560
AtPLI1	GACATCACTTACAATCTCAAAGGCTGCATTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCTTTGAACAAAACAG							
AtPLI2	GACATCACTTACAATCTCAAAGGCTGCATTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCTTTGAACAAAACAG							
<i>C.d.terrif</i>	GACATCTCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>L. mutamut</i>	GACATCTCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. moojeni</i>	GACATCACTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. jararacu</i>	GACATCACTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. erythro</i>	GACTTCACCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. neuwied</i>	GACTTCACCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. alterna</i>	GACATCACTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>B. jararaca</i>	GACATCGCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>G.b.siniti</i>	GACATCTCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGTCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>T. flavovi</i>	GACATCGCTTATAATCTCAAAGGTTGCATTTCTTCTGTCTCTGTTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
<i>P. elegans</i>	GACATCGCTTATAATCTCAAAGGTTGCATTTCTTCTGTCTCTGTTGAGTTTGAGCAATGCAACCCATGAAGAAAACAG							
	*** ** *	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	570	580	590	600				
AtPLI1	AAATTATCTGCAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
AtPLI2	AAATTATCTGCAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>C.d.terrif</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>L. mutamut</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>B. moojeni</i>	AAATTATCTGCAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>B. jararacu</i>	AAATTATCTGCAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>B. erythro</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>B. neuwied</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGATGCCATCAGA							
<i>B. alterna</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>B. jararaca</i>	AAATTATCTGCAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGA							
<i>G.b.siniti</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCTTCAA							
<i>T. flavovi</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCTTCAA							
<i>P. elegans</i>	AAATTATCTGGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCCAA							
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

## 8.2 ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS AT.PLI1 E AT.PLI2 PELO PROGRAMA *CLUSTALW*

[illegible]

### 8.3 TRADUÇÃO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO INIBIDOR DE *B. ATROX*. PELO PROGRAMA ORF FINDER

**A**

```

1 atgaaatctctacacaccatctgccttctttcatttctgttagccagaggaaactctcgggtcatgtgacttttgcacaaacgtaggaaaa
M K S L H T I C L L F I F V A R G N S R S C D F C H N V G K
91 gattcgatggttacgaaaaaggaaatgttctctccagaagatgtatgtggcaaggtctctcctggagatttcacgcatcgtgtcagtc
D C D G Y E K E C S S P E D V C G K V F L E I S S A S L S V
181 cgaactgtgcataagaactgtttctcatccagcatctgcacacttgggcacattgtataatattgggcacatcactcatatataagagga
R T V H K N C F S S I C K L G H I D V N I G H S Y I R G
271 agaatcaattgctgtgagaaaacggtggaagaccaacggtttccaggactgcccctctccagaccaaattggatactattggccctggc
R I N C C E K E P C E D Q P F P G L P L S R P N G Y Y C P G
361 gcattgggcctttttacggaggacagcactgaatttgaagctatttggcatggaaactgagactaagtgcattgacatcgtgggacacaga
A L G L F T E D S T E F E A I C H G T E T K C I D I V G H R
451 tatgaaaaatttctcctggagacatcacttacaatctcaaaaggctgcatttctcctctcctgtcgtgagtttgagcaatgcaacccatgaa
Y E N F P G D I T Y N L K G C I S S C P L L S L S N A T H E
541 gaaaacagaaattatctgcagaaagttgaatgtaaggacgccatcagattggcaagcctc600
E N R N Y L Q K V E C K D A I R L A S L

```

**B**

```

1 atgaaatctctacacaccatctgccttctttcatttctgttagccagaggaaactctcgggtcatgtgacttttgcacaaacgtgggaaaa
M K S L H T I C L L F I F V A R G N S R S C D F C H N V G K
91 gattcgatggttacgaaaaaggaaatgttctctccagaagatgtatgtggcaaggtcttctcctggagatttcacgcatcgtgtcagtc
D C D G Y E K E C S S P E D V C G K V F L E I S S A S L S V
181 cgaactgtgcataagaactgtttctcatccagcatctgcacacttgggcacattgtatgataatattgggcacatcactcatatataagagga
R T V H K N C F S S I C K L G H I D V N I G H S F I R G
271 agaatcaattgctgtgagaaaacggtggaagaccacacggtttccaggactgcccctctccagaccaaattggatactattggccctggc
R I N C C E K E P C E D Q P F P G L P L S R P N G Y Y C P G
361 gcattgggcctttttacggaggacagcactgaatttgaagctatttggcatggaaactgagactaagtgcattgacatcgtgggacacaga
A L G L F T E D S T E F E A I C H G T E T K C I D I V G H R
451 tatgaaaaatttctcctggagacatcacttacaatctcaaaaggctgcatttctcctctcctgtcgtgagtttgagcaatgcaacccatgaa
Y E N F P G D I T Y N L K G C I S S C P L L S L S N A T H E
541 gaaaacagaaattatctgcagaaagttgaatgtaaggacgccatcagattggcaagcctc600
E N R N Y L Q K V E C K D A I R L A S L

```

## 8.4 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DEDUZIDA DE AMINOÁCIDOS DE AT.PLI1 E AT.PLI2.

	Peptideo sinal																																	
		10	20	30	40	50	60	70	80																									
$\gamma$ PLI	↓																																	
At. PLI1	MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNVGKDCDGYEKECSSPEDVCGKVFLISSASLSVRTVHKNCFSSSIICKLGHIDV																																	
At. PLI2	MKSLHTICLLFIFVARGNSRSCDFCHNVGKDCDGYEKECSSPEDVCGKVFLISSASLSVRTVHKNCFSSSIICKLGHIDV																																	
	*****																																	
	Dominio $\gamma$ PLI																																	
		90	100	110	120	130	140	150	160																									
At. PLI1	NIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYYCPGALGLFTEDSTFEAICHGTETKCIDIVGHRYENFPGDITY																																	
At. PLI2	NIGHHSYIRGRINCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYYCPGALGLFTEDSTFEAICHGTETKCIDIVGHRYENFPGDITY																																	
	*****																																	
		170	180	190	200																													
At. PLI1	NLKGCISSCPLLSLSNATHEENRNYLQKVECKDAIRLASL																																	
At. PLI2	NLKGCISSCPLLSLSNATHEENRNYLQKVECKDAIRLASL																																	
	*****																																	



## 8.5 ALINHAMENTO INTERNO DAS SEQUÊNCIAS MI.PLI1 E MI.PLI2

```

10      | 20      | 30      | 40      | 50      | 60      | 70      | 80      | 90
MI.PLI1 ATGAAATCTCTACAGATCAATCTGTCTCTCTTTTCGTTTGGTAGCCAGGAGAGCTGTCACCTCACTCACTGTAATTTGTCACAATGTGGGAAA
MI.PLI2 ATGAAATCTCTACAGATCAATCTGTCTCTCTTTTCGTTTGGTAGCCAGGAGAGCTGTCACCTCACTCACTGTAATTTGTCACAATGTGGGAAA
*****
100     | 110     | 120     | 130     | 140     | 150     | 160     | 170     | 180
MI.PLI1 GATTGCGAGGTCAGGTAGAGGAATGIGGCTCTCCAGAGATCAATGTGGCAGCGGTGTGTCGGNAATTTCCAGCGGCTCTTTCCGTC
MI.PLI2 GATTGCGAGGTCAGGTAGAGGAATGIGGCTCTCCAGAGATCAATGTGGCAGCGGTGTGTCGGNAATTTCCAGCGGCTCTTTCCGTC
*****
190     | 200     | 210     | 220     | 230     | 240     | 250     | 260     | 270
MI.PLI1 CGAACCAATTCATAGAAGCTGTTTCTCATCCAGCCTCTGCAACTTAAACACTTCCGATATAAATATTGGACAATGATACTATTGAGAGGA
MI.PLI2 CGAACCAATTCATAGAAGCTGTTTCTCATCCAGCCTCTGCAACTTAAACACTTCCGATATAAATATTGGACAATGATACTATTGAGAGGA
*****
280     | 290     | 300     | 310     | 320     | 330     | 340     | 350     | 360
MI.PLI1 AGAATCCAAATGTTGTGATGAAGAAATTTGTGAAGCACTCCCAATTTCTGSACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATACCACTGTCTGGC
MI.PLI2 AGAATCCAAATGTTGTGATGAAGAAATTTGTGAAGCACTCCCAATTTCTGSACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATACCACTGTCTGGC
*****
370     | 380     | 390     | 400     | 410     | 420     | 430     | 440     | 450
MI.PLI1 ATTCTGGTCTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAGCATGAGCTATTTCGAAAGGAAACGGAACCTAAATGCATTAACATTGCGGGATACAGA
MI.PLI2 ATTCTGGTCTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAGCATGAGCTATTTCGAAAGGAAACGGAACCTAAATGCATTAACATTGCGGGATACAGA
*****
460     | 470     | 480     | 490     | 500     | 510     | 520     | 530     | 540
MI.PLI1 AAAGAAAGATTTCTGGAGACCTTGCTTATATATGTCAAAGGCTGTGTTCTCTTGTCAGAACTGACTTTGAGCAATAGACGCAAGAA
MI.PLI2 AAAGAAAGATTTCTGGAGACCTTGCTTATATATGTCAAAGGCTGTGTTCTCTTGTCAGAACTGACTTTGAGCAATAGACGCAAGAA
*****
550     | 560     | 570     | 580     | 590     | 600
MI.PLI1 GAACATAGAAATGATCTGATAAAGTTGAATGTACAGAGCGCTCCAAATATTACACCTTCC
MI.PLI2 GAACATAGAAATGATCTGATAAAGTTGAATGTACAGAGCGCTCCAAATATTACACCTTCC
*****

```

## 8.6 ALINHAMENTO MÚLTIPLO MI.PLI1 E MI.PLI2

		10	20	30	40	50	60	70	
Mi.PLI1	ATGAAATCTCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTCACTCATGTGAAA								
Mi.PLI2	ATGAAATCTCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTCACTCATGTGAAA								
N.scutatus	ATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTCACTCATGTGAAA								
N.ater	ATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTCACTCATGTGAAA								
O.scutella	ATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTGCGTCATGTGAAA								
O.microlep	ATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTGCGTCATGTGAAA								
P.textilis	ATGAAATCCCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCGTTTTGGTAGCCAGAGGAAGCTGTGCGTCATGTGAAA								
E.climaco	ATGAAATCTCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCATCTTTGTAGCCAGAGGAAGCTGCCGCTCATGTGAAA								
E.quadrivi	ATGAAATCTCTACAGATCATCTGTCTTCTTTTCATTTTTGTAGCCAGAGGAAGCTGCCGCTCATGTGAAA								
	*****								
		80	90	100	110	120	130	140	
Mi.PLI1	TTTGTACAAATGTGGGAAAAGATTGCGAGGGTCA---GGTAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
Mi.PLI2	TTTGTACAAATGTGGGAAAAGATTGCGAGGGTCA---GGTAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
N.scutatus	TTTGTACAAATTTGGGAAGAGATTGTGAGACTGAGGAGGCAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
N.ater	TTTGTACAAATTTGGGAAGAGATTGCGAGGGTGGGGTGACAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
O.scutella	TTTGTACAAATTTGGGAAGAGTTTGGGAGAGTGAGGAGGCAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
O.microlep	TTTGTACAAATTTGGGAAGAGTTTGTGAGAGTGAGGAGGCAGAGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
P.textilis	TTTGTACAAATTTGGGAAGAGTTTGGGACAAATGAGCCGGCATTGGAATGTGCCTCTCCAGAAGATCAATG								
E.climaco	TTTGTACAACTGGGAAAATGATTGTGGCTATGATTACGTAGAAGAGTGTCACTCTCCAGAAGATCAATG								
E.quadrivi	TTTGTACAACTGGGAAAATGATTGTGGCTATGATTACGTAGAAGAGTGTCACTCTCCAGAAGATCAATG								
	*****								
		150	160	170	180	190	200	210	
Mi.PLI1	TGGCACGGTGTTGCTGGATATTTACCAGCGCCTCTTCCGTCCGAACCATTCATAAAGAACTGTTTCTCA								
Mi.PLI2	TGGCACGGTGTTGCTGGATATTTACCAGCGCCTCTTCCGTCCGAACCATTCATAAAGAACTGTTTCTCA								
N.scutatus	TGGCACGGTGTTGATGGAGTTTTCATCAGCACCTATTTCCCTCCGATCCATTATAGGAAGCTGTTTCTCA								
N.ater	TGGCACAGTGTTGCTGGAGTTTCAACAGCACCTATTTCCACCCGAACCATTCATAGGAAGCTGTTTCTCA								
O.scutella	TGGCACAGTGTTGCTGGAGTTTTCATCAGCACCTATTTCCCTCCGAACCATTCATAGGAAGCTGTTTCTCA								
O.microlep	TGGCACAGTGTTGCTGGAGTTTTCATCAGCACCTATTTCCCTCCGAACCATTCAGAGAACTGTTTCTCA								
P.textilis	TGGCACAGTGTTGCTGGAGTTTTCATCGGCACCTATTTCCCTCCGAACCATTCATAGGAAGCTGTTTCTCA								
E.climaco	CGGCAAGGTGTTCTCGGAGATTTCTGTCAGCACCACTTTCCATCCGATCCATTATAGGAAGCTGTTTCTCA								
E.quadrivi	CGGCAAGGTGTTGCTGGAGATTTCTGTCAGCACCACTTTCCATCCGATCCAGTATAGGAAGCTGTTTCTCA								
	*****								
		220	230	240	250	260	270	280	
Mi.PLI1	TCCAGCCTCTGCAAACTTAAACACTTCGATATAAATATTGGACATGATACCTATTTGAGAGGAAGAATCC								
Mi.PLI2	TCCAGCCTCCGCAAACTTAAACACTTCGATATAAATATTGGACATGATACCTATTTGAGAGGAAGAATCC								
N.scutatus	TCCAGCCTCTGCAAACTCGAACGCTTTGATATAAATATTGGACATGATTCTATTTGAGAGGAAGAATCC								
N.ater	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAACGCTTTGATATAAATATTGGACATGATTCTATATGAGAGGAAGAATCC								
O.scutella	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAACACTTTGATATAAATATTGGACATGATTCTATATCAGAGGAAGAATCC								
O.microlep	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAACACTTTGATATAAATATTGGACATGATTCTATATCAGAGGAAGAATCC								
P.textilis	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAACACTTTGATATAAATATTGGACATGATTCTATATCAGAGGAAGAATCC								
E.climaco	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAGCACTTCGATGTCAATACTGGACAGGAGACCTATCTGAGAGGAAGAATCC								
E.quadrivi	TCCAGCCTCTGCAAACTTGAGCACTTCGATGTCAATACTGGACAGGAGACCTATCTGAGAGGAAGAATCC								
	*****								
		290	300	310	320	330	340	350	
Mi.PLI1	AATGTTGTGATGAAGAAAATTTGTGAAGGACTCCCATTTCTGGACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATA								
Mi.PLI2	AATGTTGTGATGAAGAAAATTTGTGAAGGACTCCCATTTCTGGACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATA								
N.scutatus	ACTGTTGTGATGAAGCAAGGTGTGAAGCACAGCAATTTCTGGACTGCCCTCTCCTTTCCAAATGGATA								
N.ater	ACTGTTGTGATGAAGCAAGGTGTGAAGCACAGCAATTTCTGGACTGCCCTCTCCTTTCCAAATGGATA								
O.scutella	ACTGTTGTGATGAAGAAAAGTGTGAAGCACAGCAATTTCTGGACTGCCCTCTCCTTTCCAAATGGATA								
O.microlep	ACTGTTGTGATGAAGAAAAGTGTGAAGCACAGCAATTTCTGGACTGCCCTCTCCTTTCCAAATGGATA								
P.textilis	ACTGTTGTGATGAAGAAAAGTGTGAAGCACAGCAATTTCTGGACTGCCCTCTCCTTTCCAAATGGATA								
E.climaco	ATTGTTGTGATGAAGAAAAGTGTGAAGGCCGCCCATTTCTGGACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATA								
E.quadrivi	ATTGTTGTGATGAAGAAAAGTGTGAAGGCCGCCCATTTCTGGACTGCCCTCTCCCATCCAAATGGATA								
	*****								
		360	370	380	390	400	410	420	
Mi.PLI1	CCACTGTCCTGGCATTCTT---GGTCTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAGCATGAAGCTATTTGCAAAGGA								
Mi.PLI2	CCACTGTCCTGGCATTCTT---GGTCTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAGCATGAAGCTATTTGCAAAGGA								
N.scutatus	CCACTGTCCTGGCATTCTT---GGTGTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAACATGAAGCTATTTGCAGAGGA								
N.ater	CCACTGCCCTGGCATTCTT---GGTTTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAACATGAAGCTATTTGCAGAGGA								
O.scutella	CCACTGCCCTGGCATTCTT---GGTGTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAACATGAAGCTATTTGCAGAGGA								
O.microlep	TCACTGCCCTGGCATTCTT---GGTGTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAACATGAAGCTATTTGCAGAGGA								
P.textilis	CCACTGCCCTGGCATTCTT---GGTGTATTCTCAGTGGACAGCTCTGAACATGAAGCTATTTGCAGAGGA								
E.climaco	CGTCTGTCTGGCGTTCTT---GGTCTATTCTCAGAGGACAGCAGTGAATCTGAAGCTGCTTGCAAAGGA								
E.quadrivi	CGTCTGTCTGGCGTTCTT---GGTCTATTCTCAGAGGACAGCAGTGAATCTGAAGCTGCTTGCAAAGGA								
	*****								

\*Continuação

	430	440	450	460	470	480	490
Mi.PLII1	ACCGAAACTAAATGCATTAAACATTGCGGGATACAGAAAAGAAAGATTTCTGGAGACCTTGCTTATAATG						
Mi.PLII2	ACCGAAACTAAATGCATTAAACATTGCGGGATACAGAAAAGAAAGATTTCTGGAGACCTTGCTTATAATT						
N.scutatus	ACTGAAACCAAATGCATTAAACCTTGCGGGATTGAGAAAAGAAAGATTTCTGGAGACATCGTTTATAATA						
N.ater	AGTGAACCAAATGCATTAAATTTGCGGGATTGAGAAAGAAAGATATCCTATAGACATCGCTTATAATA						
O.scutella	ACCGAAACCAAATGCATTAAACCTTGCGGGATTGAGAAAAGAAAGATATCCTTTAGACATCGCTTATAATA						
O.microlep	ACTGAAACCAAATGCATTAAACCTTGCGGGATTGAGAAAAGAAAGATATCCTTTAGACATCGCTTATAATA						
P.textilis	ACTGAAACCAAATGCATTAAACCTTGCGGGATTGAGAAAAGAAAGAACTCCTTTAGACATCGCTTATAATA						
E.climaco	GACGAAACCAAATGCATTAAACATTGTGGGATACAGAAAAGAAAGATTTCTGGAGACATCGCTTATAATA						
E.quadrivi	GACGAAACCAAATGCATTAAACATTGTGGGATACAGAAAAGAAAGATTTCTGGCGACATCGCTTATAATA						
	** ** *	*****	*** **	*****	*****	*	*** * *
	500	510	520	530	540	550	560
Mi.PLII1	TCAAAGGCTGTGTTCTTCTTGTCAGAACTGACTTTGAGCAATAGAACGCACGAAGAACATAGAAATGA						
Mi.PLII2	TCAAATGCTGTGTTCTTCTTGTCAGAACTGACTTTGAGCAATAGAACGCACGAAGAACATAGAAATGA						
N.scutatus	TCAAAGGTTGCACTTCTTCTTGTCAGAACTGAGGTTGAGCAATAGAACTCACGAAGAAGATAGAAATGA						
N.ater	TCAAAGGTTGCACTTCTTCTTGTCAGAACTGAGGTTGAGCAATAGAACTCACGAAGAACATAGAAATGA						
O.scutella	TCAAAGGTTGCACTTCTTCTTGTCAGAACTGAGGTTGAGCAATAGAACTCACGAAGAACACAGAAATGA						
O.microlep	TCAAAGGTTGCACTTCTTCTTGTCAGAACTGAGGTTGAGCAATAGAACTCACGAAGAACACAGAAATGA						
P.textilis	TCAAAGGTTGCACTTCTTCTTGTCAGAACTGAGGTTGAGCAATAGAACTCACGGAGGACATAGAAATGA						
E.climaco	TCAAAGGATGTGTTTCTTCTTGTCAGAACTGAGATTGAGCAATAGAACGCACGAAGAACGTAGAAATGA						
E.quadrivi	TCAAAGGATGCGTTTCTTCTTGTCAGAACTGAGATTGAGCAATAGAACGCACGAAGAACGTAGAAATGA						
	*****	* **	*****	*****	*****	*****	*****
	570	580	590	600			
Mi.PLII1	TCTGATAAAAGTTGAATGTACAGACGCCTCCAAAATTACA						
Mi.PLII2	TCTGATAAAAGTTGAATGTACAGACGCCTCCAAAATTACA						
N.scutatus	TCTAATAAAAGTTGAATGTACAGACGCCTCCAAAATTACA						
N.ater	TCTAATAAAAGTTGAATGTACAGACGCCTCCAAAATTACA						
O.scutella	GCTAATAAAAGTTGAATGTACAGATGCCTCCAAAATTACA						
O.microlep	GCTAATAAAAGTTGAATGTACAGATGCCTCCAAAATTACA						
P.textilis	GCTAATAAAAGTTGAATGTACAGACGCCCCCAAAAATTACA						
E.climaco	TCTGATAAAAGTTGAATGTAGAGACGCCGTCAAAAATTACA						
E.quadrivi	TCTGATAAAAGTTGAATGTAGAGACGCCGTCAAAAATTACA						
	** ** *	*****	*** **	*****	* **		



## M. *lemniscatus*

A

3

8.7 ANÁLISE DOS DOMÍNIOS CONSERVADOS EM MLPLI1 E MLPLI2

PLI	Peptídeo sinal	10	20	30	40	50	60	70	80
Mi. PLI1	MKSLQIIICLLFVLVARGSCHSCEICHNVGKDCGQVEECASPEDQCGIVLLDISPAPLSVRTIHKNCFSSSLCKLKHFDI								
Mi. PLI2	MKSLQIIICLLFVLVARGSCHSCEICHNVGKDCGQVEECASPEDQCGIVLLDISPAPLSVRTIHKNCFSSSLCKLKHFDI								
	*****								
		90	100	110	120	130	140	150	160
Mi. PLI1	NIGHDTYLRGRIQCCEENCEGLPFFGLPLSHPNGYHCPGILGLFSVDSSEHEAICKGTETKINIAGYRKERFFGDLAY								
Mi. PLI2	NIGHDTYLRGRIQCCEENCEGLPFFGLPLSHPNGYHCPGILGLFSVDSSEHEAICKGTETKINIAGYRKERFFGDLAY								
	*****								
		170	180	190	200				
Mi. PLI1	NVKGCVSSCPELTLSNRTHEEHRNDLIKVECTDA SKIIP								
Mi. PLI2	NVKGCVSSCPELTLSNRTHEEHRNDLIKVECTDA SKIIP								
	*** *****								





## 8.9 ALINHAMENTO E COMPARAÇÃO DE DOMÍNIO CONSERVADO DE MI.PLI1 E 2 COM SEQUÊNCIAS DE $\gamma$ PLIs DO GENBANK

[illegible]

## 8.10 ALINHAMENTO DE MI.PLI1 E MI.PLI2 COM DOMÍNIO CTLD DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS

```

10      |
20      |
30      |
40      |
50      |
60      |
70      |
80      |
90      |

MI.PLI1 MKSLQIIICLLFVLVARGSCHSCEICHNVGRDCEGQVEECASPEDQCGTVLLDISPAPLSVRTIHRNCFSSSLCKLKHFDINIGHDTYLRG
MI.PLI2 MKSLQIIICLLFVLVARGSCHSCEICHNVGRDCEGQVEECASPEDQCGTVLLDISPAPLSVRTIHRNCFSSSLCKLKHFDINIGHDTYLRG
CTLD    -----YKFESTEKKIWEDAQAFCQSLG-----GHLAS-----IHSEAENDFVASLLK-----NSGSSDYV-----
          :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
100      |
110      |
120      |
130      |
140      |
150      |
160      |
170      |
180      |

MI.PLI1 RIQCCDEENCEGLPFPGPLPSHPNGYHCPGILGLFSVDSSEHEAICKGTETKCNINAGYRKERFPGDLAYNVKGCVSSCPELTLSNRTHE
MI.PLI2 RIQCCDEENCEGLPFPGPLPSHPNGYHCPGILGLFSVDSSEHEAICKGTETKCNINAGYRKERFPGDLAYNVKGCVSSCPELTLSNRTHE
CTLD    -----WIG-P-MNSSG-DCV-----VLSTSGGKNDVS-----CT--S-----KLF-----F-----VCE-----
          :  +  +  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```